

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-502597

(P2002-502597A)

(43) 公表日 平成14年1月29日 (2002.1.29)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト* (参考)
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A 2 G 0 4 5
C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	A 4 B 0 2 9
G 0 1 N 27/447		G 0 1 N 33/48	Z 4 B 0 6 3
33/48		33/50	Z
33/50		33/53	Z

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 81 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-530590 (P2000-530590)
 (86) (22) 出願日 平成11年2月1日 (1999.2.1)
 (85) 翻訳文提出日 平成12年8月7日 (2000.8.7)
 (86) 国際出願番号 PCT/US99/02099
 (87) 国際公開番号 WO99/40174
 (87) 国際公開日 平成11年8月12日 (1999.8.12)
 (31) 優先権主張番号 09/018, 918
 (32) 優先日 平成10年2月5日 (1998.2.5)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (81) 指定国 EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), AU, CA, JP

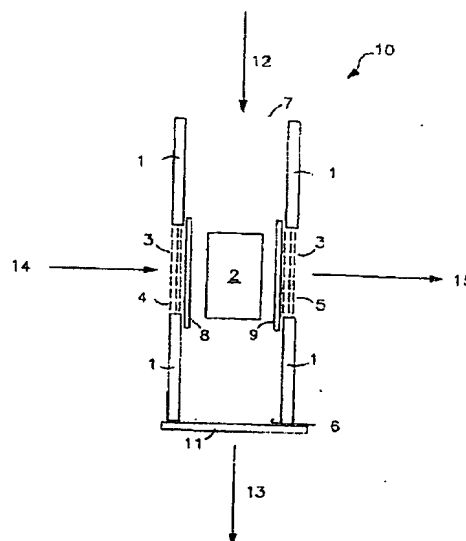
(71) 出願人 アクレイラ パイオサイエンス, インコーポレイティド
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 94043-1432, マウンテン ビュー, ペアー アベニュー 1288
 (72) 発明者 ネルソン, ロバート ジェイ.
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 94501, アラメダ, マリナ ビレッジ パークウェイ 909 #145
 (74) 代理人 弁理士 石田 敬 (外4名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 統合マイクロ流体装置

(57) 【要約】

少なくとも濃縮チャンネル(10)および主電気泳動流路(12)からなる統合マイクロ流体装置が提供される。本発明の統合装置において、不要流体が排出口(6)を通して前記主電気泳動流路から離れる方向に流れるように、濃縮チャンネルおよび主電気泳動流路は位置決定されている。本発明の装置は、種々の電気泳動の用途、例えば、臨床的アッセイ、ゲノムについての高い処理量スクリーニングおよび薬学的用途、ポイント・オブ・ケア (point-of-care) in vitro 診断、分子遺伝的分析および核酸診断、細胞分離、および一般に生物研究において使用される。



BEST AVAILABLE COPY

【特許請求の範囲】

【請求項1】 入口と流体連絡しかつ並列の立体配置で配置された第1 および第2 の別々のマイクロチャンネル部分を有する分岐マイクロチャンネル部分を有する少なくとも1 つのマイクロチャンネルをもつ表面を有する支持体を使用して、第1 および第2 の生物学的細胞の型の微小混合物を分析する方法であって、前記第1 および第2 のマイクロチャンネル部分の各々は濃縮領域と、前記濃縮領域から下流の検出領域とを有し、前記方法は第1 および第2 の生物学的細胞の型の前記混合物を前記入口を通して少なくとも1 つのマイクロチャンネルの中に導入し、前記第1 および第2 の生物学的細胞の型を前記前記第1 および第2 のマイクロチャンネル部分の各々における濃縮領域に動電学的に移し、第1 マイクロチャンネル部分において濃縮領域中の第1 生物学的細胞型を捕捉し、第2 マイクロチャンネル部分において濃縮領域中の第2 生物学的細胞型を捕捉し、第2 生物学的細胞型を第1 マイクロチャンネル部分における濃縮領域から第1 マイクロチャンネル部分における検出領域から離れる方向に動電学的に輸送し、第1 生物学的細胞型を第2 マイクロチャンネル部分における濃縮領域から第2 マイクロチャンネル部分における検出領域から離れる方向に動電学的に輸送し、第1 生物学的細胞型を第1 マイクロチャンネル部分における濃縮領域から第1 マイクロチャンネル部分における検出領域に動かして動電学的に輸送し、第2 生物学的細胞型を第2 マイクロチャンネル部分における濃縮領域から第1 マイクロチャンネル部分における検出領域に動かして動電学的に輸送し、第1 マイクロチャンネル部分の検出領域において第1 生物学的細胞型を分析し、そして第2 マイクロチャンネル部分の検出領域において第2 生物学的細胞型を分析する工程を含み、これにより微小混合物中の第1 および第2 の生物学的細胞の型を同時に微小混合物から分離しかつ分析することができる、前記方法。

【請求項2】 捕捉工程が第1 または第2 の生物学的細胞の型を抗体により捕捉することを含む、請求項1 に記載の方法。

【請求項3】 捕捉工程が第1 または第2 の生物学的細胞の型を磁気物体により捕捉することを含む、請求項1 に記載の方法。

【請求項4】 輸送工程が洗浄媒質を前記第1 および第2 のマイクロチャン

ネル部分の濃縮領域に通過させることを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項5】 動かす工程が溶離緩衝液を前記第1 および第2 のマイクロチャンネル部分の濃縮領域に通過させることを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項6】 分析工程が、第1 マイクロチャンネル部分の検出領域における第1 生物学的細胞型の存在を検出し、そして第2 マイクロチャンネル部分の検出領域における第2 生物学的細胞型の存在を検出することを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項7】 表面と、支持体の中に形成された濃縮領域および作用領域を有する少なくとも1つのマイクロチャンネル部分とを有する支持体を使用して核酸試料をクリーンアップする方法であって、前記方法は核酸部分と不要部分とを有する核酸混合物を少なくとも1つのマイクロチャンネル中に導入し、濃縮領域において核酸混合物と複数のアフィニティー結合捕捉分子および解放分子とを接触させて核酸部分の少なくとも一部分を捕捉し、こうして核酸部分の前記一部分を不要部分から分離し、ここで核酸混合物の不要部分は作用領域を通して流れず、核酸部分の前記一部分を作用領域に輸送し、これにより核酸部分の前記一部分を作用領域において処理もしくは分析または処理および分析する工程からなる、前記方法。

【請求項8】 前記複数のアフィニティー結合捕捉分子および解放分子を少なくとも1つの固体の支持体に結合させる、請求項7に記載の方法。

【請求項9】 少なくとも1つの固体の支持体が複数の磁気物体を含む、請求項8に記載の方法。

【請求項10】 少なくとも1つの固体の支持体が複数の常磁性物体を含む、請求項8に記載の方法。

【請求項11】 核酸混合物の核酸部分がDNA 増幅反応生成物を含む、請求項7に記載の方法。

【請求項12】 核酸混合物の核酸部分がDNA 配列決定反応生成物を含む、請求項7に記載の方法。

【請求項13】 核酸混合物の不要部分が核酸試料の処理または分析を汚染する望ましくない塩を含む、請求項7に記載の方法。

【請求項14】 表面と、支持体の中に形成された濃縮領域および作用領域を有する少なくとも1つのマイクロチャンネル部分とを有する支持体、および相補的第1および第2の結合メンバーを有するアフィニティー結合対を使用して、核酸試料をクリーンアップする方法であって、前記方法は核酸部分と不要部分とを有する核酸混合物を少なくとも1つのマイクロチャンネル中に導入し、アフィニティー結合対の第1結合メンバーを少なくともいくつかの核酸混合物の核酸部分に結合させて標識化核酸部分を形成し、濃縮領域において標識化核酸部分を少なくとも1つの固体の支持体に結合したアフィニティー結合対の第2結合メンバーを接触させて標識化核酸部分の少なくとも一部分を捕捉しかつ捕捉核酸部分を形成し、捕捉核酸部分を洗浄して捕捉核酸部分を排除した不要部分および核酸部分を作用領域から離れる方向に向け、第1結合メンバーよりも第2結合メンバーに対して高いアフィニティーを有する競合置換メンバーで、捕捉核酸部分に結合した第1結合メンバーを競合置換することによって捕捉核酸部分を解放して、精製された核酸部分を生成し、精製された核酸部分を作用領域に輸送し、これにより精製された核酸部分を作用領域において処理もしくは分析または処理および分析する工程を含む、前記方法。

【請求項15】 結合工程を導入工程後に実施する、請求項14に記載の方法。

【請求項16】 導入工程を結合工程後に実施する、請求項14に記載の方法。

【請求項17】 作用領域において精製された核酸部分を増幅する工程をさらに含む、請求項14に記載の方法。

【請求項18】 増幅工程が精製された核酸部分についてPCR増幅を実施する工程を含む、請求項17に記載の方法。

【請求項19】 作用領域において精製された核酸部分を核酸配列決定する工程をさらに含む、請求項14に記載の方法。

【請求項20】 核酸配列決定工程が精製された核酸部分を配列決定するジデオキシ酵素的連鎖停止配列決定の工程を含む、請求項19に記載の方法。

【請求項21】 第1結合メンバーが、第2結合メンバーに対してビオチン

よりも低いアフィニティーを有する、修飾されたビオチン分子を含む、請求項14に記載の方法。

【請求項22】 修飾されたビオチン分子がデチオビオチンである、請求項21に記載の方法。

【請求項23】 修飾されたビオチン分子がデチオビオチン誘導体である、請求項21に記載の方法。

【請求項24】 第2結合メンバーがアビジンをベースとするタンパク質を含む、請求項14に記載の方法。

【請求項25】 少なくとも1つの固体の支持体が複数の磁気物体を含む、請求項14に記載の方法。

【請求項26】 少なくとも1つの固体の支持体が複数の常磁性物体を含む、請求項14に記載の方法。

【請求項27】 競合置換メンバーがビオチン分子を含む、請求項14に記載の方法。

【請求項28】 核酸混合物の核酸部分がDNA 鋳型および配列決定プライマーを含む、請求項14に記載の方法。

【請求項29】 核酸混合物の核酸部分が末端のデオキシヌクレオチドの類似体を含む、請求項14に記載の方法。

【請求項30】 核酸混合物の核酸部分がデオキシヌクレオチドを含む、請求項14に記載の方法。

【請求項31】 第1結合メンバーがデチオビオチンを含み、前記第2結合メンバーがアビジンをベースとするタンパク質を含み、そして競合置換メンバーがビオチン分子を含み、作用領域において精製された核酸部分に対してPCR増幅を実施する工程をさらに含む、請求項14に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、マイクロ流体、特に流体を少なくとも一部分電界の適用により操作するマイクロ流体装置に関する。

【0002】

電気泳動は、核酸、タンパク質、炭水化物の純粋な試料の分離、同定および調製、複雑な混合物中の特定の分析物の同定、およびその他を包含する、種々の用途において広範に使用されているので、バイオテクノロジーおよび他の産業において欠くことのできない手段となった。電気泳動のより広い分野において、毛管電気泳動(CE)は特に重要であり、ここで特定の实在物または種は毛管寸法の電気泳動チャンバー中の媒質を通して加えた電界の影響下に動かされる。CEの利益は急速な運転時間、高い分離効率、小さい試料体積、およびその他を包含する。CEは本来毛管中で実施されたが、マイクロチャンネル電気泳動(MCE)として知られている、平らな支持体上の毛管寸法のマイクロチャンネルまたは溝を使用する実施において重要性が増加している。CEおよびMCEは基本的研究および工業的方法の双方における、多数の異なる用途における使用が増加している。このような用途は、分析、生物医学、薬学、環境、分子、生物学、食品および臨床における用途を包含する。

【0003】

CEおよびMCEは多数の利点を有するにもかかわらず、これらの技術の潜在的利益は種々の理由でまだ完全には実現されてきていない。CEおよびMCEにおいて使用されている電気泳動チャンバーの特質のために、約 10^{-6} Mより低い分析物濃度を有する試料ではすぐれた結果は一般に得られない。このより低い分析物濃度の検出限界は、CEおよびMCEの潜在的用途をかなり制限した。例えば、問題の分析物がしばしば複雑な試料、例えば、血液または尿の中にフェムトモル〜ナノモルの濃度で存在する臨床的用途において、CEおよびMCEは広く使用されてきていない。

【0004】

CEの希釈限界を改良するために、種々の技術が開発されてきており、このよう

な技術の例は改良された試料注入手法、例えば、分析物のスタッキング(Beckers & Ackermans, " The Effect of Sample Stacking for High Performance Capillary Electrophoresis, " J.Chromatogr.(1993)629:371-378) 、フィールド増幅(Chien & Burgi, " Field Amplified Sample Injection in High-Performance Capillary Electrophoresis, " J.Chromatogr.(1991)559:141-152) 、および一時的等速電気泳動(Stegehuis et al. , " Isotachophoresis as an On-Line Concentration Pretreatment Technique in Capillary Electrophoresis, " J.Chromatogr.(1991)538:393-402) 、ならびに改良された試料検出手法および「オフ・ライン」分割調製手法である。

【0005】

CEを使用して達成可能な分析限界を改良するために開発された他の技術は、毛管から直接上流に配置される、すなわち、「オン・ライン」または「単一流路」の関係に配置される、分析物前濃縮装置を使用することである。本明細書において使用するとき、用語「オン・ライン」または「単一流路」は、分析物前濃縮成分の中に導入される流体のすべて、すなわち、もとの試料体積の濃縮された画分および残りの不要画分、が装置の主電気泳動部分、すなわち、分離媒質を含む毛管、を通して必然的に流れる関係を意味するために使用される。使用されてきている種々の立体配置の概観は、下記の文献に記載されている: Tomlinson et al. , " Enhancement of Concentration Limits of Detection in CE and CE-MS: A Review of On-Line Sample Extraction, Cleanup, Analyte Preconcentration, and Microreactor Technology, " J.Cap.Elec.(1995)2:247-266、およびその中の図面。

【0006】

この後者のアプローチは分析物検出限界に関して、特に検出の濃度限界に関して改良された結果を提供することができるが、それはCEの他の面に対して有害な衝撃を与え、これにより全体の達成可能な性能を低下させることがある。例えば、分析物のピーク幅は分析物前濃縮装置を含むオン・ラインまたは単一流路装置においてより広いことがある。

【0007】

したがって、低い濃度の分析物、特にフェムトモル～ナノモルの範囲の分析物濃度を有する試料を使用して、すぐれた結果を提供することができる改良されたCE装置の開発に関心がもたれてきている。

MCE 装置は米国特許第5,126,022 号、米国特許第5,296,114 号、米国特許第5,180,480 号、米国特許第5,132,012 号、および米国特許第4,908,112 号に開示されている。MCE 装置を記載する他の参考文献下記のを包含する：Harrison et al.、" Micromachining a Miniaturized Capillary Electrophoresis-Based Chemical Analysis System on a Chip. " Science(1992)261:895; Jacobsen et al.、" Precolumn Reactions with Electrophoretic Analysis Integrated on a Microchip. " Ann.Chem.(1994)66:2949; Effenhauser et al.、" High-Speed Separation of Antisense Oligonucleotides on a Micromachined Capillary Electrophoresis Device. " Ann.Chem.(1994)66:2949; および Woolley & Mathies、" Ultra-High-Speed DNA Fragment Separations Using Capillary Array Electrophoresis Chips. " P.N.A.S. USA(1994)91:11348。

【0008】

CEの前に試料の「オン・ライン」で分析物を前濃縮する装置および方法を開示する特許は、米国特許第5,202,010 号、米国特許第5,246,577 号、および米国特許第5,340,452 号を包含する。CEにおいて使用する分析物の前濃縮の種々の方法は下記の文献において概観されている：Tomlinson et al.、" Enhancement of Concentration Limits of Detection in CE and CE-MS: A Review of On-Line Sample Extraction, Cleanup, Analyte Preconcentration, and Microreactor Technology. " J.Cap.Elec.(1995)2:247-266。

(発明の要約)

少なくとも濃縮チャンネルと、主電気泳動流路とを含む統合電気泳動マイクロ装置、ならびに電気泳動の用途においてそれらを使用する方法が提供される。濃縮チャンネルは、引き続いて主電気泳動流路を通して動くために、液体試料中の特定の画分を濃縮する働きをする。本発明の装置において、濃縮チャンネルからの不要流体が主電気泳動流路を通して流れず、その代わりに排出口を通して流れように、濃縮チャンネルおよび電気泳動流路は位置決定される。本発明の装置は、

本発明の装置は、実在物が加えられた電界に応答して媒質を通して動かされる、種々の電気泳動の用途において使用される。本発明の装置は、高い処理量のスクリーニング；ゲノムおよび薬学的用途、例えば、遺伝子の発見、薬剤の発見、および開発、および臨床の開発；ポイント・オブ・ケア (point-of-care) in vitro 診断；分子遺伝的分析および核酸診断；細胞分離、例えば、細胞の単離および捕捉；および一般に生物研究において特に有用である。

(詳細な説明)

少なくとも濃縮チャンネルと、主電気泳動流路を含む統合電気泳動マイクロ装置が提供される。濃縮チャンネルは、液体試料中の特定の分析物を含む画分を濃縮する働きをする。濃縮チャンネルからの不要流体が主電気泳動流路を通して流れず、その代わりに主電気泳動流路から離れる方向に排出口を通して流れように、濃縮チャンネルおよび主電気泳動流路はこの装置において位置決定される。本発明の装置は、本発明の装置は、種々の電気泳動の用途、例えば、臨床的アッセイにおいて使用することができる。本発明をさらに記載するとき、装置をまず一般的な用語で記載し、次いで図面を参照して本発明の装置のそれぞれの特定の態様を論ずる。

【0009】

本発明の装置は統合電気泳動マイクロ装置である。統合とは、装置の構成部分のすべて、すなわち、濃縮チャンネル、主電気泳動流路、およびその他が単一の、コンパクトな、取扱い容易なユニット、例えば、チップ、ディスクまたはその他で存在することを意味する。装置は電気泳動装置であるので、それらは実在物、例えば、分子、粒子、細胞およびその他が加えられた電界の影響下に媒質を通して動かされる、広範な種類の用途において有用である。実在物の特質、例えば、実在物が電荷を担持するかどうか、ならびに電気泳動が実施される電気泳動チャンバーの表面化学に依存して、印加電界の直接的影響下に、あるいは電界の印加から生ずる通路を通るバルクな流体流、例えば、電気浸透流 (EOF) の結果として、実在物は媒質を通して動かされることができる。マイクロ装置は主電気泳動流路としてマイクロチャンネルを含むであろう。マイクロチャンネルとは、媒質が存在する主電気泳動流路の電気泳動チャンバーがチャンバーを通る毛管流を提供す

る断面積を有する導管、例えば、溝またはチャンネルであり、ここでチャンパーは平らな支持体上に存在することを意味する。これについては、より詳細に後述する。

【0010】

本発明によれば、装置は濃縮チャンネルを含み、この濃縮チャンネルは試料入口および少なくとも1つの流体出口を含み、そして試料の特定の画分を濃縮する濃縮媒質を含有する；必要に応じて、装置は第2流体出口をさらに含む。濃縮チャンネルの目的は、初期の試料を処理してその特定の画分について濃縮することであり、ここで濃縮される特定の画分は1またはそれより多い問題の分析物を包含する。こうして、濃縮チャンネルは、ターゲット分析物を含有する画分を初期の試料体積の残りの成分から選択的に分離する働きをすることができる。ターゲットを含有する画分は濃縮チャンネル内で得ることができ、そして残部は廃棄またはそれ以上の下流の処理のためにチャンネルからフラッシュ排出することができる；あるいは、選択された成分は濃縮チャンネル内に保持し、そしてターゲットを含有する画分をそれ以上の処理のために下流に通すことができる。

【0011】

装置を使用する特定の用途に依存して、濃縮チャンネルは多数の異なる機能を提供することができる。濃縮チャンネルは問題の分析物を初期の試料体積よりも小さい体積にする働きをすることができる、すなわち、それは分析物濃縮装置として働くことができる。さらに、濃縮チャンネルは潜在的に妨害する成分が主電気泳動流路に入り、それを通して流れることを防止する働きをする、すなわち、それは「クリーンアップ」手段として働くことができる。さらに、濃縮チャンネルは流体試料の中に存在するターゲット分析物に対する調製的方法、例えば、化学的、免疫学的、および酵素的な方法、例えば、標識化、タンパク質消化、DNA消化またはフラグメント化、DNA合成、およびその他のためのマイクロ反応器として働くことができる。

【0012】

濃縮チャンネルは、その中に収容されている特定の濃縮媒質に依存して、種々の立体配置で装置の中に存在することができる。チャンネルの内部の体積は一般

に約1p1 ~1ml、通常約1p1 ~100nl の範囲であり、ここでチャンネルの長さは一般に約1mm ~5mm、通常10mm~1mm の範囲であり、そして断面寸法（例えば、幅、高さ）は約1mm ~200mm、通常約10mm~100mm の範囲である。チャンネルの断面形状は円形、楕円、長方形、台形、正方形、または他の好都合な形状であることができる。

【0013】

種々の異なる濃縮媒質が濃縮チャンネルの中に存在することができる。代表的媒質または手段は、米国特許第5,202,010号、米国特許第5,246,577号および米国特許第5,340,452号、ならびにTomlinson et al., 前記（それらの開示は引用することによって本明細書の一部とされる）に開示されている分析物前濃縮装置に記載されている手段を包含する。本発明の統合マイクロチャンネル電気泳動装置において使用するために適当な、この分野において知られている特定の濃縮手段は下記のものを含む：Kasicka & Prusik, " Isotachophoretic Electrodesorption of Proteins from an Affinity Adsorbent on a Microscale, " J.Chromatogr. (1983)273:117128 に記載されているタンパク質前濃縮装置において使用されているもの；米国特許第5,202,101号およびW093/05390号に記載されているようなアフィニティ吸着剤を含む毛管束；Cai & El Rassi, " On-Line Preconcentration of Triazine Herbicides with Tandem Octadecyl Capillaries-Capillary Zone Electrophoresis, " J.Liq.Chromatogr. (1992)15:1179-1192 に記載されているようなオクタデシルシランでコーティングされた固相；Cai & El Rassi, " Selective On-Line Preconcentration of Proteins by Tandem Metal Chelate Capillaries-Capillary Zone Electrophoresis, " J.Liq.Chromatogr. (1993)16:2007-2024 に記載されているような金属キレート化層でコーティングされた固相；米国特許第5,246,577号に記載されているような逆相HPLC固体パッキング材料；Cole & Kennedy, " Selective Preconcentration for Capillary Zone Electrophoresis Using Protein G Immunoaffinity Capillary Chromatography, " Electrophoresis (1995)16:549-556 に記載されているようなプロテイン Gでコーティングされた固相；米国特許第5,423,966号に記載されているような溶融性アガロースゲル；Guzman, " Biomedical Applications of On-Line Capillary Z

one Electrophoresis Using an Analyte Concentrator: Investigation of Design Optics. " J.Liq.Chromatogr. (1995) 18:3751-3568 に記載されているようなアフィニティー吸着材料；および米国特許第5,318,680 号に記載されているような固相反応器材料。前述の特許および他の刊行物の各々の開示は引用することによって本明細書の一部とされる。

【0014】

濃縮媒質として使用することができる濃縮媒質の1つのクラスは、クロマトグラフィーの媒質または材料、特に収着相材料である。このような材料は下記のことを包含する：逆相材料、例えば、C8またはC18化合物でコーティングされた粒子；イオン交換材料；アフィニティークロマトグラフィー材料、ここで結合メンバーは不溶性マトリックスに共有結合されており、ここで結合メンバーは基特異的であることができ、例えば、レクチン、酵素コファクター、プロテインA およびその他、または物質特異的であることができ、例えば、抗体またはその結合フラグメント、問題の特定の抗体に対する抗原、オリゴヌクレオチドおよびその他であり、ここで結合メンバーが結合する不溶性マトリックスは粒子、例えば、多孔質ガラス、重合体ビーズ、磁気ビーズ、ガラスのストランドまたはフィラメントのネットワーク、複数の細いロッドまたは毛管、チャンネルの壁およびその他であることができる。濃縮手段として使用するクロマトグラフィー材料の特質に依存して、クロマトグラフィー材料を濃縮チャンネルの中に保持するために保持手段を使用することが必要であろう。好都合には、ガラスフリットまたはアガロースゲルのプラグを使用してチャンバーの流体の出口または入口をカバーすることができ、ここでフリットまたはプラグは濃縮チャンネルの中から外に流体を流すが、粒子または他の不溶性マトリックスを流さない。濃縮手段がクロマトグラフィー材料である態様において、典型的には試料を濃縮チャンネルの中に導入し、それを通して流す。試料が濃縮チャンネルを通して流れるとき、分析物を含む画分はクロマトグラフィー材料により濃縮チャンネルの中に保持され、そして試料の残りの不要部分は不要部分の出口を通してチャンネルから流出するであろう。

【0015】

濃縮手段がポリマービーズまたは常磁性ビーズまたは粒子のベッドである態様において、ビーズを抗体または他のターゲット特異的アフィニティー結合成分でコーティングすることができ、このような抗体または成分は下記のを包含する：種々の哺乳動物細胞マーカー、特にヒト細胞マーカー、例えば、T細胞、T細胞サブセット、B細胞、単球、幹細胞、骨髄細胞、白血球、およびHLAクラスII陽性細胞のマーカーの任意のものに対するアフィニティー精製されたモノクローナル抗体；B細胞、T細胞、およびT細胞のサブセットの単離のための、種々の齧歯類細胞マーカー、特にマウス、ラットまたはウサギの免疫グロブリンの任意のものに対する二次抗体；任意の所定の生体分子でカスタムコーティングのための未コーティングまたはトシル活性化された形態；およびビオチニル化抗体とともに使用するためのストレプトアビジンでコーティングされた形態。常磁性ビーズまたは粒子は磁場の適用により濃縮チャンネルの中に保持することができる。

【0016】

あるいは、濃縮手段として固相材料、例えば、コーティングされた粒子または他の不溶性マトリックスに加えて、コーティングされたおよび／または含浸された膜を使用することができ、このような膜は試料の分析物を含む画分を選択的に保持すると同時に、試料の残部を膜を通してかつ濃縮手段の中から外に不要部分の出口を通して流れさせる。本発明において使用できる固相抽出において使用するために、種々の親水性膜、疎水性膜およびイオン交換膜が開発されてきている。例えば、下記の文献を参照のこと：Tomlinson et al., " Novel Modification s and Clinical Applications of Preconcentration-Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry. " J.Cap.Elect.(1995)2:97-104; およびTomlinson et al., " Improved On-Line Membrane Preconcentration-Capillary Electrophoresis-Mass(mPC-CE)." J.High Res.Chromatogr.(1995)18:381-3.

【0017】

あるいは、また、さらに、濃縮チャンネルまたは濃縮媒質は多孔質膜またはフィルターを包含することができる。ゲノムDNA およびウイルスの核酸を捕捉するために適当な材料は、血液、組織、およびウイルスRNA を分析するための、QIAC

ENにより名称QIAmp で市販されているものを包含し、そして植物の細胞および組織からDNA を捕捉するために適当な材料は、QIAGENにより名称DNeasyで市販されているものを包含する。

【0018】

装置の立体配置に依存して、任意の多数の異なる手段、および手段の組合わせにより、濃縮チャンネルを通して試料を流れさせることができる。ある装置の立体配置において、試料に対する重力の結果が、装置を通して試料を流れさせるために十分であることがある；ある立体配置において、装置を選択した軸の回りに回転させて、所望の方向に遠心力を付与することができる。他の態様において、活性ポンプ手段を使用して、その中に収容されている濃縮チャンネルおよび濃縮手段を通して試料を動かすことができる。他の態様において、洗浄および溶離工程の間に、磁力を加えて試料を動かすか、あるいは常磁性ビーズターゲット複合体を捕捉または固定化することができる。なお本発明の他の態様において、電極を使用して、濃縮チャンネルを通して流体を動かす電界を印加することができる。次いで溶離液体を濃縮媒質を通して流させて、濃縮された試料の画分を材料から解放させ、それを主電気泳動流路に運搬する。一般に、印加された電界を使用して、濃縮チャンネルを通して溶離液体を動かす。

【0019】

また、電気泳動ゲル媒質を本発明の用途において濃縮手段として使用することができる。多様な異なる篩分け能力を提供するゲル媒質は知られている。媒質の孔サイズを変化させ、異なる多孔度の2 またはそれ以上のゲル媒質を使用し、および／または濃縮チャンネルと主電気泳動流路との間で孔サイズの勾配を設けかつ適当な関係を選択することによって、初期の試料の問題の分析物を含む画分が主電気泳動流路の中に入ることを保証することができる。例えば、主濃縮チャンネルを交差する濃縮チャンネルを含む装置を構築することができ、ここで濃縮チャンネルは、試料流の方向において、大きい多孔度のスタッキングゲルおよび微細な多孔度の第2 ゲルからなり、ゲルの間の境界は濃縮チャンネルおよび主電気泳動流路の交差に存在する。この態様において、試料がスタッキングゲルの中に導入されそして電界が濃縮チャンネル中のゲルに加えられた後、試料の成分はス

タッキングゲルを通して動き、濃縮チャンネルおよび主電気泳動流路の交差における界面に狭いバンドで凝縮する。次いで濃縮された試料画分の狭いバンドが主電気泳動流路の中に入りかつそれを通して動くように、第2 電界を主電気泳動流路に加える。あるいは、濃縮チャンネルは多孔度の勾配を有するゲルを含むことができる。この態様において、問題の1 またはそれより多いバンドが濃縮チャンネルおよび電気泳動流路の交差に到達するとき、問題の1 またはそれより多いバンドは主電気泳動流路に入り、それに沿って動くことができる。

【0020】

核酸の濃縮および／または精製に特に有用である濃縮媒質は、配列特異的捕捉媒質ならびに遺伝的捕捉媒質を包含する。遺伝的捕捉媒質は、例えば、下記のことを包含する：核酸に非特異的に結合し、かつ試料中の実質的にすべてのDNA に結合することを期待することができるイオン交換およびシリカ樹脂または膜；試料中の実質的にすべての一本鎖DNA に結合することを期待することができる、固定化された一本鎖DNA 結合性タンパク質(SSBタンパク質)；試料中の実質的にすべてのmRNAに結合することを期待することができる、ポリdT修飾ビーズ。配列特異的捕捉媒質は、種々の捕捉分子の任意のものがその上に固定化されるビーズ、膜または表面、例えば、下記のことを包含する：試料中の相補的配列を有する核酸に結合することを期待することができる、オリゴヌクレオチドのプロープ；試料中の相補的配列とハイブリダイゼーションした溶液相バイオチニル化プロープに結合することを期待することができる、ストレプトアビジン。捕捉分子の固定化に適当なビーズは、化学的または物理的に架橋したゲルおよび多孔質または非多孔質樹脂、例えば、ポリマーまたはシリカをベースとする樹脂を包含する。

【0021】

タンパク質に適当な捕捉媒質は下記のことを包含する。タンパク質に適当な捕捉媒質は、イオン交換樹脂、例えば、アニオン交換樹脂(例えば、DEAE)およびカチオン交換樹脂；疎水性相互作用化合物(例えば、C4、C8およびC18 化合物)；スルフヒドリル；ヘパリン；固有的に活性な表面(例えば、プラスチック、ニトロセルロースプロットティング紙)；活性化プラスチック表面；芳香族色素、例えば、チバクロン(Cibacron)ブルー、レマゾール(Remazol) オレンジ、およびブ

ロチオン(Procion) レッドを包含する。タンパク質の炭水化物部分について、レクチン、固定化疎水性オクチルおよびフェニルアルカン誘導体が適当であることがある。酵素について、特異的酵素支持体-産物遷移-状態の中間体の類似体が適当であることがある。レセプターに適当な捕捉媒質は、レセプターリガンドアフィニティー化合物を包含する。

【0022】

前述したように、濃縮チャンネルは少なくとも1つの入口および出口を含むであろう。もちろん、単一の入口が存在する場合、入口はこのプロセスの濃縮相において濃縮チャンネルに試料を送り、そしてこのプロセスの溶離相の間に単離媒質を入れる働きをしなくてはならない。そして単一の出口が存在する場合、出口は濃縮媒質が保持した画分を欠く試料の部分を排出し、そして溶離相の間に濃縮された画分を主電気泳動マイクロチャンネルに入れる働きをしなくてはならない。濃縮チャンネルの中に収容されている特定の濃縮手段、ならびに特定の装置の立体配置に依存して、濃縮チャンネルは、例えば、試料の入口および溶離緩衝液の入口として働く、2以上の流体入口を有することができる；あるいは、濃縮チャンネルは、例えば、不要部分の出口および濃縮された画分の流体出口として働く、2以上の流体出口を有することができる。流体が濃縮チャンネルから直ちに主電気泳動流路の中に流れるように、濃縮チャンネルが主濃縮チャンネルと直接的に流体連絡している場合、すなわち、濃縮チャンネルおよび主電気泳動流路が結合されている場合、濃縮チャンネルは、不要部分の出口に加えて、試料の濃縮された画分がそれを通して主電気泳動流路の中に流れる、濃縮された画分の流体出口を含むであろう。例えば、濃縮チャンネルの中へ洗浄溶媒および／または溶離溶媒を導入するために、好都合であるとき、このような溶媒を流体の溜から濃縮チャンネルの中に輸送するために、1またはそれ以上の追加の流体入口を設けることができる。濃縮チャンネルを通るバルクの流体流をコントロールするために、例えば、不要試料が主電気泳動流路の中に流入するのを防止するために、コントロール手段、例えば、弁、膜、およびその他を入口および出口の各々に関連させることができる。濃縮チャンネルを通して流体および実在物、例えば、試料、溶離緩衝液、試薬、反応物、洗浄またはすすぎ溶液、およびその他を動かすこ

とを望む場合、濃縮チャンネルの中に存在する物質および流体に電界を印加することができる電極を設けることができる。

【0023】

本発明の装置の次の構成成分は主電気泳動流路である。主電気泳動流路は種々の立体配置、例えば、管様、溝様または他の好都合な立体配置を有することができる、ここで流路が存在する平らな支持体の表面上に流路がマイクロチャンネルを形成するように、流路の断面形状は円形、楕円形、正方形、長方形、三角形およびその他であることができる。マイクロチャンネルは、マイクロチャンネルを通して毛管流体流を提供する断面積を有し、ここで断面寸法の少なくとも1つ、例えば、幅、高さ、直径は少なくとも1mm、通常少なくとも約10mmであるが、約200mmを超えず、通常約100mmを超えないであろう。統合装置の特定の特質に依存して、主電気泳動流路は平らな支持体の表面上で線状、曲線または他の好都合な形状であることができる。

【0024】

主電気泳動流路、ならびに追加の電気泳動流路は、それに関連して、流路の中に存在する媒質へ電界を加える少なくとも1対の電極を有するであろう。単一对の電極を使用するとき、典型的にはこの対の一方のメンバーは通路の各端に存在するであろう。好都合には、米国特許第5,126,022号（その開示は引用することによって本明細書の一部とされる）に記載されているように、複数の電極を電気泳動流路に関連させることができ、ここで複数の電極は電気泳動流路に沿って実在物を正確に動かすことができる。本発明の装置において使用する電極は、電極が関連する電気泳動流路の中に存在する媒質に適当な電界を加えることができる任意の好都合な型であることができる。

【0025】

濃縮チャンネルおよび主電気泳動流路は、試料の実質的に濃縮された画分のみが主電気泳動流路を通して流れるように、装置の中に位置決定されることが、本発明にとって重大である。この目的で、装置は濃縮された画分以外の試料の部分、例えば、不要部分を主電気泳動流路から離れる方向に排出する排出口をさらに含むであろう。こうして、濃縮チャンネルが主電気泳動流路と直接的に流体連絡

している場合、濃縮チャンネルを通る不要流体流路は主電気泳動流路と交差関係にあるであろう。濃縮チャンネルおよび主電気泳動流路が間接的流体連絡にあるように、それらが第2 電気泳動流路により接続されている、本発明の他の態様において、濃縮チャンネルを通る不要流体流路は必ずしも主電気泳動流路と交差関係にある必要はない；不要流体流路および主電気泳動流路は互いに対して平行であることができる。

【0026】

本発明の装置は、また、濃縮された画分を濃縮チャンネルから主電気泳動流路に移す手段を含む。特定の装置の立体配置に依存して、濃縮された画分の転移手段は、濃縮された画分の流体出口、二次電気泳動通路、または他の適当な転移手段であることができる。主電気泳動流路に加えて第2 電気泳動流路を設けることによって、濃縮チャンネルから主電気泳動流路への濃縮された試料画分の導管として、第2 電気泳動流路を使用する可能性が存在する。不要部分の出口が唯一の流体出口である態様において、濃縮チャンネルおよび主電気泳動流路が間接的流体連絡にあるように、二次電気泳動流路の存在は必須であろう。

【0027】

濃縮された試料の転移手段として働く主電気泳動流路および二次電気泳動流路に加えて、本発明の装置は1 またはそれ以上の追加の電気泳動流路をさらに含むことができ、このような流路は毛管寸法をもつか、あるいはもたないことができ、そして種々の目的のために働くことができる。複数の電気泳動流路を含む装置では、種々の立体配置、例えば、複数の電気泳動流路が主電気泳動流路と流体連絡している分岐した立体配置が可能である。米国特許第5,126,022 号（その開示は引用することによって本明細書の一部とされる）参照。

【0028】

装置の中に存在する主電気泳動流路および／または任意の二次電気泳動流路は、必要に応じて、通常、流路の一方または双方の端、すなわち、いずれかの端に流体溜を含むであろう。溜が設けられている場合、溜は種々の目的、例えば、緩衝液、溶離溶媒、試薬、すすぎおよび洗浄溶液、およびその他を主電気泳動流路の中に導入する手段、不要流体を電気泳動流路から受け取る手段、およびその他

として働くことができる。

【0029】

本発明の装置の中に存在することができる他の任意の成分は、濃縮チャンネルから初期の試料体積の不要部分を受け取り、貯蔵する不要流体の溜であり、ここで不要流体の溜は排出口と流体連絡している。特定の装置の立体配置に依存して、排出口は不要部分の出口と同一であるか、あるいはそれと区別することができる、そして不要流体の溜の中に開口するか、あるいは装置から出口を提供することができる。不要流体の溜は装置の中にチャンネル、隔壁、または装置の他の成分を妨害しない、他の好都合な立体配置として存在することができる。

【0030】

本発明の装置は、また、試料の試料調製手段の中への導入を促進する界面手段を必要に応じて含むことができる。例えば、試料を注射器により装置の中に導入する場合、装置は装置の中への注射器の針のガイド、シール、およびその他として働く、注射器の界面を含むことができる。

装置を製作する材料の特定の形状および特質に依存して、電気泳動流路の中に含有される媒質中の特定の種の存在の検出のための検出領域が主電気泳動流路に少なくとも関連する。検出領域における主電気泳動流路の少なくとも1つの領域は、光学的に透明であり、一般に180～1500nm、通常220～800nm、より通常250～800nmの範囲の波長の光を通過させて、低い透過損失を有する材料から製作される。適当な材料は、溶融シリカ、プラスチック、石英ガラス、およびその他を包含する。

【0031】

統合装置は、濃縮チャンネルおよび主電気泳動流路、ならびに任意の追加の成分を含むことができる、任意の好都合な構成を有することができる。装置はマイクロチャンネル電気泳動装置であるので、電気泳動流路は平らな支持体の表面上に存在し、ここで支持体は、必ずしも必要ではないが、通常平らな板でカバーされて、表面上に存在するマイクロチャンネルを環境からシールしている。一般に、装置は小さく、表面の平面において約200mm以下、通常約100mm以下の最長寸法を有するので、装置は容易に取扱われ、操作される。前述したように、装置は

種々の形状を有することができ、このような形状は平行六面体、例えば、クレジットカードまたはチップ様、ディスク様、注射器または任意の他のコンパクトな、好都合な形状を包含する。

【0032】

本発明の装置は広範な種類の材料、例えば、ガラス、熔融シリカ、アクリル樹脂、熱可塑性物質、およびその他から製作することができる。統合装置の特定の使用、経済的問題、溶媒の相溶性、光学的透明度、色、機械的強度、およびその他に依存して、統合装置の種々の成分は同一であるか、あるいは異なる材料から製作することができる。例えば、マイクロチャンネル電気泳動流路を含む平らな表面およびカバープレートの双方は、同一材料、例えば、ポリメチルメタクリレート(PMMA)、または異なる材料、例えば、PMMAの支持体およびガラスのカバープレートから製作することができる。製作の容易さおよび材料のコストのために、使い捨て統合装置を望む用途のために、装置は典型的にはプラスチックから製作されるであろう。検出および製作を容易とするために、全体の装置は光学的に透明（この用語が上記において定義された）であるプラスチック材料から製作することができる。また、電気泳動の条件下に表面電荷が低いプラスチックはある用途において重要性を有する。使用される特定のプラスチックの例は、ポリメチルメタクリレート、ポリカーボネート、ポリエチレンテレフタレート、ポリスチレンまたはスチレンコポリマー、およびその他である。

【0033】

装置は、任意の好都合な手段、例えば、慣用の成形および流延技術により製作することができる。例えば、プラスチック材料から製造される装置では、装置の平らな支持体中のチャンネル構造がネガティブであるシリカの型マスターは、エッチングまたはレーザーのマイクロ機械加工により製造することができる。支持体の中にチャンネルを形成する上昇したうねを有することに加えて、シリカの型は濃縮チャンネルを収容するキャビティを平らな支持体の中に提供する上昇した区域を有することができる。次に、ポリマーの前駆体配合物をシリカのマスターと平らな支持プレート、例えば、ガラス板との間で熱的に硬化または光重合することができる。好都合である場合、米国特許第5,110,514号（その開示は引用する

ことによって本明細書の一部とされる)に記載されている手順を使用することができる。平らな支持体が製作された後、濃縮チャンネルを平らな支持体中のキャビティの中に配置し、そして必要に応じて電極を導入することができる。最後に、カバープレート和支持体の表面の上に配置し、それに対してシールし、これにより統合装置を形成することができる。カバープレートは、任意の好都合な手段、例えば、超音波溶接、接着剤、およびその他を使用して、支持体に対してシールすることができる。

【0034】

一般に、本発明の装置を使用する前に、適当な第1のまたは電気泳動媒質を装置の電気泳動流路またはマイクロチャンネルの中に導入し、ここで第1媒質は濃縮チャンネルの中に存在する濃縮媒質と異なるであろう。電気泳動媒質は、本明細書において、電界を加えて媒質を通して種を動かすための任意の媒質を意味するために使用される。電気泳動媒質は、電気泳動流路の端に存在する溜を通して好都合に導入することができるか、あるいはカバープレート和支持体に対してシールする前に電気泳動流路のチャンネルまたはチャンバーの中に直接導入することができる。任意の好都合な電気泳動媒質を使用することができる。特定の用途に依存して、使用するために適当な電気泳動媒質は、下記の文献に開示されているように、緩衝液、架橋および非架橋ポリマーの媒質、有機溶媒、洗浄剤、およびその他を包含する：Barron & Blanch、"DNA Separations by Slab Gel and Capillary Electrophoresis: Theory and Practice," Separation and Purification Methods(1995)24:1-118、ならびに米国特許出願第08/636,599号および第08/589,150号および米国特許第5,569,364号、それらの開示は引用することによって本明細書の一部とされる。電気泳動媒質として、セルロース誘導体、ポリアクリルアミド、ポリビニルアルコール、ポリエチレンオキシド、およびその他は特に重要である。

【0035】

図面を参照して、本発明をさらに説明する。第1図は、本発明の装置において使用できる濃縮チャンネルの線図である。濃縮チャンネル10は、逆相C18材料2を取り囲む側壁1からなる。チャンネル10は、流体入口7および4および流体出

口5 および6 をさらに含む。チャンネルの入口および出口を通る流体流をコントロールするために、弁8、9 および11が設けられている。ガラスフリット3 は流体を入口4 および出口5 を通して流れさせるが、逆相材料2 をチャンネルの中に保持する。この濃縮チャンネルを使用するとき、試料を試料入口7 を通して流路12の方向に導入する。試料がチャンネル10を通して動くとき、分析物を含む画分は逆相材料2 上に保持されるが、試料の残りの不要画分は流路13に沿って不要部分の出口6 から流出する。弁8 および9 を閉じて、試料が入口4 または出口5 の中から外に流れるか、あるいは「放出」されるのを防止する。試料がチャンネル10を通して流れた後、弁11を閉じ、そして弁8 および9 を開く。次いで溶離緩衝液をチャンネル10の中にガラスフリット3 および入口4 を通して流路14の方向に導入する。溶離緩衝液は材料2 を通して動き、試料の保持された画分は解放され、溶離緩衝液と一緒に、濃縮された画分の出口5 から外にフリット3 を通して流路15に沿って流れる。

【0036】

第2 図において、第1 図に示すのと同じ濃縮チャンネルが描写されているが、ただし逆相材料2 は結合対メンバーが共有結合している架橋したガラスフィラメント16の網状組織で置換されている。

第3A図は、本発明によるクレジットカードの形状（平行六面体）の装置の上面線図である。装置30は第1 端に溜32および第2 端に溜33を有する電気泳動流路31を含む。濃縮チャンネル34は主電気泳動流路31と直接的に流体連絡している（オーバーヘッドから見て）。電気泳動流路31の中に存在する媒質に電界を加えるために、電極35および36が設けられている。流路の中に含有されている媒質の中に存在する分析物を見るために、検出領域37が電気泳動流路31の上に位置決定されている。検出領域は、また、濃縮チャンネル34の上に設けることができる。第3A図に示されている装置は単一の濃縮チャンネルを含むが、追加の濃縮チャンネルは、検出領域を包含する、流路の中に設けることができる。

【0037】

第3B図は、第3A図に描写されている装置の側面線図である。本発明のこの態様を使用するとき、試料は注射器界面38を通して濃縮チャンネル34の中に導入され

、ここで試料の分析物を含む画分は保持され、この時不要画分は排出口39を通して濃縮チャンネル34の中から外にかつ装置の中から外に流出する。次いで溶離緩衝液は口40を通して溜32の中に導入される。次いで電界を電極35および36の間に加え、溶離緩衝液を溜32から濃縮チャンネル34を通してかつ電気泳動流路31に沿って溜33に移動させる。溶離緩衝液が濃縮チャンネル34を通して動くとき、溶離緩衝液は初期の試料体積の保持された分析物を含む画分を解放し、それを電気泳動流路31の中に運搬する。

【0038】

第4図は本発明の1態様の線図であり、ここで濃縮チャンネル62は主電気泳動流路52から二次電気泳動流路55により分離されている。装置50では、試料は注射器界面66を通して濃縮チャンネル62の中に導入される。試料が濃縮チャンネル62を通して流れるとき、不要試料は排出口64を通して不要流体の溜63の中に流れる。次いで電界を電極61および60の間に加え、溜57の中に存在する溶離緩衝液を濃縮チャンネル62を通して動かし、分析物を解放させる。次いで分析物は溶離緩衝液と一緒に二次電気泳動流路55に沿って運搬される。分析物が交差51に到達したとき、電極61および60の間の電界を電極59および58の間の電界と置換する。本発明のこの態様および他の類似の態様において、分析物が交差51に到達する時間は、交差における分析物の存在を検出するか、あるいは、分析物の特定の特質、流路中の媒質、電界の強度、およびその他に基づいて、分析物が交差に到達する時間を実験的に決定することによって、決定することができる。それぞれ、溜54および53の中に配置されている、電極59および58の間の電界の印加後、分析物は交差51から電気泳動流路52に沿って溜53に向かってかつ検出領域65を通して動く。

【0039】

第5図は本発明のなお他の態様の上面線図であり、ここで濃縮チャンネルは単一の流体の入口および出口を含む。装置70は、二次電気泳動流路73と交差する関係において電気泳動流路71を含む。濃縮チャンネル72は、二次電気泳動流路73に沿って交差82から上流に存在する。この態様を使用するとき、試料は注射器界面80を通して濃縮チャンネル72の中に導入され、これにより試料の分析物を含む画分は濃縮チャンネルの中に存在する材料に可逆的に結合する。次いで電極81およ

び79の間に電界を加え、これにより試料の非可逆的に結合したまたは不要画分は濃縮チャンネル72の中から外に、二次電気泳動流路73に沿って、交差82を過ぎて、排出口84から外に不要流体の溜78の中に動かされる。次いで溶離緩衝液は注射器界面80を通して濃縮チャンネル72の中に導入され、電極81および79の間に印加された電界は、溶離緩衝液を濃縮チャンネル72を通して二次流電気泳動流路73の中に流れさせ、それと一緒に分析物を運搬する。分析物が交差82に到達したとき、電極79および81の間の電界を電極76および77の間の電界と置換し、これにより分析物を主電気泳動流路71に沿って、検出領域99を通して溜74に向かって動かす。

【0040】

第6図に線図的示されている装置は、第1図～第5図の装置のクロマトグラフィー的濃縮手段の代わりに、電気泳動濃縮手段を有する濃縮チャンネルからなる。装置90において、試料を溜96の中に導入し、電界を電極87および88の間に加え、試料を溜98に向かって移動させる。試料が溜98に向かって移動するとき、試料は比較的大きい孔サイズを有するスタッキングゲル93の中に入り、比較的微細な孔サイズの二次ゲル92に向かって移動する。界面94において、試料の成分は狭いバンドに圧縮される。この時点において、電極87および88の間の電界を電極89および90の間の電界で置換し、これにより界面93における試料成分の狭いバンドは主電気泳動流路95の中に、検出領域91を過ぎて、溜85に向かって移動する。装置90において、スタッキングゲルの構成の代わりに、界面93の領域における分子サイズ膜を準備することができ、これは限界質量以下の試料成分を選択的に通過させ、かつ限界質量を超える試料成分を膜表面に保持させる。第6図試料入口装置のなお他の態様において、電極を界面93の位置に存在させることができ、これにより適当な電位を印加して93の領域に問題の試料成分を維持し、こうして93の領域において成分を濃縮させることができる。例えば、問題のアニオン分析物について、試料を溜96の中に導入し、93および87の間に電界を印加し、ここで93を正電極とし、87を接地すると、アニオンは93の領域に向かって移動し、そこで濃縮する。分析物が電極93の領域において濃縮した後、次いで電界を89および90の間に印加して、アニオン分析物を溜85に向けて移動させることができる。

【0041】

第7図は、第3図～第6図のクレジットカード形の態様と反対に、本発明の装置のディスク形の態様の上面線図である。装置100において、試料をまず濃縮チャンネル102の中に導入する。次いで電界を電極108および109の間に印加し、溶離緩衝液103を濃縮チャンネル102を通して動かし、これにより濃縮チャンネル102の中に保持された分析物は解放され、溶離緩衝液とともに交差114に運搬される。次いで電極108および109の間の電界を110および111の間の電界と置換し、分析物を交差114から主電気泳動流路112に沿って、検出領域113を過ぎて、溜107に向けて動かす。

【0042】

他の態様は第8図～第19図を参照することによって理解することができ、それらの図面のいくつかは第1図～第7図のスケッチに示す態様に対応する。例えば、第8図を参照すると、第1図または第2図に示す濃縮チャンネルのフローダイアグラムが対応する識別数字とともに示されている。したがって、第1図および第2図を参照して説明すると、試料は濃縮チャンネル10の中に流路12を経由して試料入口7から入る。試料が濃縮チャンネル10を通して動くとき、問題の画分含有画分は濃縮媒質上に保持され、この媒質は、例えば、逆相C18材料（第1図を参照して説明したような）またはガラスフィラメントの網状組織に共有結合した結合対メンバー（第2図を参照して説明したような）であることができるが、残りの不要画分は不要部分の出口6を通して流路13に沿って流出する。適当な量の試料が濃縮チャンネル10を通して流れた後、入口7および出口6を通る流れは停止し、そして溶離緩衝液は流路14を経由して入口4を通して濃縮チャンネル10の中に入る。濃縮チャンネル10内で、問題の保持された画分は濃縮媒質上を通過する溶離緩衝液の中に解放され、濃縮された画分の出口5を通過して流路15を経由する。

【0043】

そして第9図を参照すると、第3A図、第3B図における2つの図面にスケッチされかつそれらを参照して説明した装置30の態様のフローダイアグラムが示されている。このフローダイアグラムにおいて、濃縮チャンネル（第3A図、第3B図、第

9 図において34) は正方形で表されている；種々の溜（例えば、第3A図、第3B図、第9 図において32、33) は流路（チャンネル）の端において小さい円形で表されている、流路は線（例えば、第3A図、第3B図、第9 図において主電気泳動流路31) により表されている；電極（第3A図、第3B図、第9 図において35、36) は溜の円形の中心に走るヘアラインにより表されている；注射器注射のための界面（ここで1 つが存在する、例えば、第3B図、第9 図において38) は試料入力流路の端において台形により表されている；そして検出領域（第3A図、第3B図、第9 図において37) は主濃縮チャンネルに接する太い矢印により表されている。同様に、第12図において、第6 図においてスケッチされかつそれを参照して説明された装置90の態様のフローダイアグラムが示されている。この態様において、濃縮チャンネル（第12図において120) は電気泳動濃縮により働き、これは濃縮チャンネル120 が主濃縮チャンネル95と交差する点において問題の画分を蓄積させる。濃縮チャンネルを通る試料物質の動きは、電極87、88の間の電位差の印加により達成することができ；そして濃縮チャンネルから主濃縮チャンネルを通して検出領域91への問題の画分の溶離は、電極89、90の間の電位差の印加により達成することができる。第6 図を参照して前述したように、蓄積点はスタッキングゲル93と二次ゲル92との間の界面94であることができ；そしてさらなる変更においては適当な電位を界面93の部位において電極（第12図において121) に印加して、濃縮チャンネルのその領域において成分を濃縮することができる。

【0044】

第10図は装置50の態様のフローダイアグラムであり、ここで第4 図においてスケッチされかつそれを参照して説明されたように、濃縮チャンネル62は主電気泳動流路52から二次電気泳動流路55により分離されている。同様に、第13図は第7 図においてスケッチされかつそれを参照して説明されたような装置100 のディスク形態様のフローダイアグラムである。第13図は試料を注射器界面66から濃縮チャンネル102 の中に導入するとき使用する試料入力流路と、不要流体を不要流体の溜63へ行かせると同時に問題の画分を濃縮チャンネルの中に保持媒質上に保持させるとき使用する排出口64とを示す。これらの特徴は第7 図または第4 図の上面図に示されていない。

【0045】

第11図において、装置70のフローダイアグラムが示されており、ここで第5図においてスケッチされかつそれを参照して説明されたように、濃縮チャンネル72の中への、ただ1つの流体入口、および1つの流体出口が存在する。注射器界面を経由する溶液の注入の間、流体入口116は試料入口として働き、そして流体出口118は不要部分の出口として働く。問題の画分が濃縮チャンネル中の保持媒質により保持される間、不要画分は下流に二次電気泳動流路73を通して、二次電気泳動流路と主電気泳動流路71との交差82を横切って、排出口84の中に流れ、これは不要画分を主電気泳動流路71から離れる方向に不要流体の溜78へ向ける。溶離の間に、溶離緩衝液は注射器界面を経由して注入され；流体入口116は溶離緩衝液入口として働き、そして流体出口118は二次濃縮チャンネルへの濃縮された画分の出口として働く。問題の画分は溶離緩衝液の中に動き、ここでそれは電極79、81を横切って印加された電圧により生成した電界により動電学的に推進されて、二次濃縮チャンネルと主濃縮チャンネルとの交差に到達する。いったん問題の画分が交差に到達すると、電圧を電極76、77を横切って印加して、問題の画分中の1またはそれより多い分析物を主電気泳動流路の中にかつそれに沿って検出ゾーン99に推進させる。

【0046】

第5図を参照して説明したように、濃縮チャンネルから上流でありかつ排出口から下流において電極の間に電界を印加することによって、不要画分（濃縮媒質に結合しない物質）を濃縮チャンネルの中から外にかつ主電気泳動流路から離れる方向に洗浄除去することができる。すなわち、溶離緩衝液を濃縮チャンネルの中に導入する前に、液状洗浄媒質を濃縮媒質の上に通しかつ排出口を通して排出して、不要画分成分を運搬し去る。任意の種々の物質は、それが濃縮媒質から問題の画分を実質的に溶離しないかぎり、洗浄媒質として適当である。そのうえ、溶離の前に、濃縮媒質に結合するか、あるいはそうでなければそれと会合することができる望ましくない成分の選択的解放または除去を促進するように、洗浄媒質を選択することができる。例えば、問題の成分がDNAフラグメントである場合、洗浄媒質はタンパク質またはポリペプチドを選択的に分解するか、あるいはRN

A を選択的に分解する酵素を含有して、溶離前に、問題の画分からこれらの汚染物質の除去を促進することができる。あるいは、例えば、問題の成分がタンパク質である場合、洗浄媒質はDNase およびRNase を含有することができる。

【0047】

濃縮チャンネルの中へのかつそれを通る種々の液体の順次の動きは、濃縮チャンネルの上流部分に各このような液体のための溜および流路を設けることによって容易にコントロールすることができる。例えば、第14図のフローダイヤグラムに図解するように、試料溜218 から走行する試料供給流路220 により、洗浄媒質溜217 から走行する洗浄媒質流路218 により、および溶離媒質溜215 から走行する溶離媒質流路216 により、濃縮チャンネル210 への入力212 を供給する。これらの物質の動きは、それぞれの溜における電極および濃縮チャンネルの出力214 から下流の適当な点(種々の構成について本明細書において記載するような)における電極を横切って電位を印加させることによって、選択的にコントロールすることができる。タンパク質に適当な洗浄媒質は、例えば、pH調節緩衝剤および有機溶媒を包含し;そして洗浄は、例えば、洗浄媒質のイオン強度または温度を調節することによって実施することができる。

【0048】

他の物質をその上入力流路に導入することができ、そして、特に、試料を濃縮チャンネル上に動かす前に、試料それ自体を前処理するために、1 またはそれより多い試薬の流れを準備することができる。体液(例えば、血液、リンパ液、羊水、脳脊髄液、または尿)の粗製試料を試料流路中で試薬と組合わせることによって、それを前処理することができる。例えば、酵素または洗浄剤を含有する試薬を混合することによって、全血の粗製試料中の細胞からDNA を解放することができる。

【0049】

濃縮チャンネルから下流で他の流路の構成を使用することができ、そしてこれらのあるものは問題の画分の成分の下流の処理または分析の特定の種類について多少の利点を提供することができる。例えば、第15図において、二次電気泳動流路は主電気泳動流路を横切らず、むしろ、主電気泳動流路238 は二次電気泳動流

路236とT字形交差において結合する(第12図参照)。この構成において、主電気泳動流路の上流のアームは二次電気泳動流路236と同一のチャンネル中を走行する。本明細書に記載する、他の構成において、試料は試料溜233から試料流路234を経由して濃縮チャンネル230の中に入り、そして濃縮段階の間に、不要流体は濃縮チャンネル230から二次電気泳動流路236を経由して出て、次いでT字形交差237を過ぎて、排出口240を通して離れる方向に不要流体の溜241に行く。

【0050】

いったん濃縮段階が完結すると、洗浄媒質を濃縮チャンネルに通過させ、また、排出口を通して排出させることができる。洗浄媒質を試料供給流路を経由して導入するか、あるいは、第14図を参照して前述したように、必要に応じて、別の洗浄媒質から導入することができる。不要流体の溜241および、それぞれ、試料溜233(および、必要に応じて、不要流体の溜)における電極(図面に示されていない)を横切って電界を印加することによって、試料および洗浄媒質の動きを達成することができる。次いで、溶離媒質を溶離緩衝液溜231から溶離緩衝液通路235を経由して、濃縮チャンネル230の中にかつそれを通して、二次電気泳動通路236を通して動かすことができる。溶離画分の成分から下流の媒質を主電気泳動流路238から離れる方向にかつ不要流体排出流路240を経由して外に向けて、下流の問題の成分の大部分を交差237に到達させることができる。次いで電位を溜239において印加して、成分を二次電気泳動流路236から交差237を通してかつ主電気泳動流路238内に検出領域242に向けてかつそれを通して推進させることができる。

【0051】

例えば、第5図、第12図に示すように、「注入交差」における主電気泳動流路および二次電気泳動流路の交差は、試料プラグの正確な計量を望む場合、例えば、主電気泳動流路を電気泳動分離のために使用する場合、好都合であることがある。このような注入交差を使用すると、問題の画分からの試料成分の形状寸法的に定められたプラグを交差から注入することができる。

【0052】

他方において、試料プラグの正確なコントロールを望まない場合、特に溶離された試料の全体を主電気泳動流路を通して動かすことを望む場合、T字形交差は好ましいことがある。例えば、溶離された画分の実質的に全体を交差から下流の1列のアフィニティーゾーンに通過させることによって、成分を分析する場合、このような構成は有利であることがある。

【0053】

1例として、第16図は1系列のアフィニティーゾーン244、246、248、250を有する構成における流れを示す線図である。各アフィニティーゾーンは、問題の画分の選択された成分に対して特異的アフィニティーをもつ濃縮媒質を有する。例えば、問題の画分は粗製ライゼイト中のDNAから成り、ここでライゼイトは濃縮チャンネル230から上流で形成され、濃縮チャンネル230において濃縮および/または精製されていることができるので、主電気泳動流路238の中に入った溶離された画分は異なる長さおよび塩基組成のDNAフラグメントの複雑な混合物から主として成る。各ハイブリダイゼーションゾーン自体は濃縮チャンネルであり、ここで濃縮媒質はターゲットDNA中の配列に対して相補的な配列を有する固定化されたオリゴヌクレオチドのプロープを含む。溶離された画分が系統的にアフィニティーゾーン244、246、248、250を通過するとき、アフィニティーゾーンの1つにおけるプロープに対して相補的である画分の中に存在するターゲットDNAはそのアフィニティーゾーンにおいて結合するようになる。アフィニティーゾーンは検出器243、245、247、249を有し、これらの検出器はアフィニティーゾーンにおいて結合した問題の成分からのシグナル（例えば、蛍光または電気化学的ルミネセンス）を検出し、必要に応じて、定量するように構成されている。当業者は理解するように、アフィニティーゾーンにおける捕捉原理として、任意の形態の生体分子の認識を使用することができる。アフィニティーの有用な型は下記のものを包含する：抗体-抗原の相互作用；ポリdTとアデニル化RNAとの結合；RNA、DNA、PNAに対するオリゴヌクレオチドのプロープ；ストレプトアビジン-ビオチンの結合；タンパク質-DNAの相互作用、例えば、DNA結合性プロテインGまたはプロテインA；および基特異的アフィニティーを有する分子、例えば、アルギニン、ベンズアミジン、ヘパリン、およびレクチン。他の例は

当業者にとって明らかであろう。

【0054】

したがって、例えば、捕捉の原理はレセプターーリガンドの結合、抗体ー抗原の結合、およびその他を包含し、こうして、本発明による方法および装置はイムノアッセイ、レセプター結合アッセイ、およびその他を実施するために、ならびに核酸のハイブリダイゼーションアッセイのために有用である。

あるいは、前述したように、主電気泳動流路は二次電気泳動流路との交差から下流で分岐し、例えば、第17図に示すように、主電気泳動流路の並列な配列を形成することができる。電気泳動流路238は、4つの主電気泳動流路の分岐がそれらのそれぞれの不要流体の溜262、264、266、268に対して下流に走行するように、2回二またに分岐するように示されている。この例において分岐はアフィニティーゾーン254、256、258、260を有し、検出器253、255、257、259をもつ。環境の関係する性質（例えば、温度、pH、緩衝液の条件、およびその他）は、下記において第22図を参照していっそう詳細に示すように、互いに独立に各流路の分岐において好都合にコントロール可能である。

【0055】

アフィニティーゾーンは、例えば、第17図におけるように、並列に配置されている場合、各アフィニティーゾーンは主濃縮チャンネルに送出される全体の試料のアリコートを受取る。この態様において、2またはそれ以上のアフィニティー媒質により捕捉することができる試料の成分は、それぞれの2またはそれ以上のアフィニティーゾーンにおいて現れるであろう。例えば、2つのプローブ配列に対して相補的の2つの配列の一方または双方を含有する核酸フラグメントは、並列の配置において、それらの2つのプローブを含有する2つのアフィニティーゾーンにおいて捕捉されるであろう。他方において、アフィニティーゾーンが直列に配列されている場合、例えば、第16図におけるように、各下流のアフィニティーゾーンにはそれから上流のアフィニティーゾーンにより捕捉されなかった試料の成分のみが到達する。ここで、例えば、2つのアフィニティーゾーンにおけるプローブの配列に対して相補的である2つの配列の双方を含有する核酸フラグメントは、2つのアフィニティーゾーンよりいっそう上流においてのみ捕捉され

るであろう。1つの部分または配列を含有し、他の部分または配列を含有しない試料の成分を同定しようとする場合、この配置は好都合であることがある。

【0056】

そしてまた、前述したように、濃縮され、溶離された試料を処理するために、複数の主電気泳動流路を設けることができる。例えば、第18図に示されているように、主電気泳動流路270は溶離された試料の画分を二次電気泳動流路236から1系列の交差272を通して運搬することができる。各主電気泳動流路270は上流の溜(274)および下流の溜(276)を有し、そして各々は検出器278を有する。この構成は単一の濃縮された試料の画分のアリコートについて1組の試験またはアッセイまたは測定を実施するために使用することができ、そして、前述したように、分析物の量の正確な媒質を望む場合、特に有用であろう。理解されるように、主電気泳動流路270の各々は、第16図、第17図を参照して前述したように、アフィニティーゾーンまたはアフィニティーゾーンの列(第18図示されていない)を有することができる。

【0057】

あるいは、例えば、第19図において示すように、複数の濃縮チャンネル280は分岐した試料供給マニホールド281から試料を受け取ることができる。各濃縮チャンネル280は、溶離段階の間に、主電気泳動流路284との交差288に濃縮された画分を送出することができる。濃縮段階の間に(および必要に応じて洗浄段階の間に)、不要画分は交差288から分岐した排出マニホールド283を経由してかつ排出口240を通して外に不要流体の溜241に運搬される。このような配置は、例えば、問題の画分がDNAの混合物である場合、およびDNAについて配列の情報およびサイズの情報の双方を得ようとする場合、特に好都合に使用することができる。第19図の構成は、例えば、サザンブロット分析に類似する流動(flow-through)分析のために使用することができる。慣用のサザンブロット分析において、DNAフラグメントをまずゲル上で分離し、次いで膜に移し、その上でプローブを相補的フラグメントに結合させる。サザンブロット分析は主としてマニュアル卓上手順として実施され、そして高度に労働を要し、完結するために数日を必要とする。流動分析は、本発明によれば、実質的に自動化することができ、そしてこの

分析は非常に迅速に完結することができる。

【0058】

流動分析において、濃縮チャンネルの1つを除外した各々は配列特異的捕捉媒質、例えば、配列特異的固定化オリゴヌクレオチドのプローブを有し、そして濃縮チャンネルの最後の1つは試料中のDNAフラグメントのすべてに結合する遺伝的捕捉媒質を有する。これらの異なる濃縮された画分は溶離段階の間に交差288に送出され、次いで各々が検出器286を有するそれぞれの主電気泳動流路284中で電気泳動的に動かされる。遺伝的捕捉媒質を含有する濃縮チャンネルからの濃縮された画分は、試料からのすべてのサイズのDNAの混合物を含有し、ある範囲の電気泳動移動度を有し、検出器を順次に通過し、1系列のシグナルのピークを生ずる。他の濃縮チャンネルの各々からの濃縮された画分は、そのそれぞれの濃縮チャンネル中の特異的捕捉媒質に対して相補的なDNAのみを含有する。

【0059】

粒状支持体上のアフィニティー結合性因子を使用すると、流路のある立体配置において、生物学的実在物の混合集団における2またはそれ以上のサブセットの間から選択された生物学的実在物のサブセットを効率よく分離することができ、ここで各サブセットは特徴的な決定因子を有する。例えば、各々の中に生物学的実在物のサブセット上の決定因子に選択的に結合することができる捕捉因子を保持する、いくつかの濃縮チャンネル、またはアフィニティーゾーンを並列に配置することができる。捕捉因子は、第1サブセットの特徴的決定因子に、直接的または間接的に、特異的に結合するレセプターからなる第1捕捉因子、および少なくとも1つの他のサブセットの特徴的決定因子に、直接的または間接的に、特異的に結合するレセプターからなる少なくとも第2捕捉因子を包含する。各捕捉因子が結合するサブセットは、各捕捉因子のターゲットサブセットである。第1サブセットへの第1捕捉因子のレセプターの特異的結合、および少なくとも1つの他のサブセットへの第2捕捉因子のレセプターの特異的結合に好適な条件下に、生物学的実在物の混合集団の試料を複数の捕捉因子と接触させ、ここで捕捉因子の少なくとも1つはそのそれぞれのサブセットに解離可能に結合されている。

【0060】

次に、結合したサブセットを、試料からおよび捕捉因子に結合しない生物学的実在物の集団の任意のサブセットから分離する。その後、解離可能に結合したサブセットの1つをそれが結合した捕捉因子から解離させ、その後単離する。単離され、選択されたサブセットは通常それ以上のプロセッシングのために回収され、このようなプロセッシングは分析および／または増殖を包含する。

【0061】

前述した、これらの解離および単離の工程を反復して第2 および第3、所望ならば、それ以上の選択されたサブセットを生成することができるが、ただしそのターゲットサブセットからの1つの捕捉因子の解離はその選択されたターゲットサブセットからの他の捕捉因子の解離を生じない。

本発明の装置および方法によれば、操作パラメーターおよび装置の構成は従来達成可能でなかった生物学的および他の分離の成功した性能を可能とする。リガンドが静止固体の支持体に結合されている、慣用のアフィニティー分離、例えば、アフィニティークロマトグラフィーにおいて、ターゲット物質の捕捉および分離は同時の事象である。本発明の態様におけるように、粒状磁性因子を使用する分離について、これらの2つの事象は分離されている。本発明の好ましい態様に従うこれらの2つの事象の分岐は有意な利点を提供する。

【0062】

本発明の方法において、アフィニティー結合反応をそれぞれの特異的切断反応とカップリングさせる。こうして、アフィニティー結合／切断対をつくることによって、各分離手順について2つの独特な特異性が生ずる。収集表面上でこのような実在物の混合集団から生物学的実在物の1またはそれ以上の選択されたサブセットを分離しようとする場合、この追加のパラメーターは事象の順列を可能とし、こうして困難であるか、あるいは不可能であった分離を本発明に従い比較的容易に実施することができる。

【0063】

本発明以前において、生物学的実在物の混合集団から独特な、選択されたサブセットの分離および引き続く解放のために粒子を使用することに対する顕著な障害は、非選択物質の認められる汚染なしに選択したサブセットを混合集団から除

去できるような方法で、生物学的実在物を収集しなくてはならないことであった。本発明の実施において、この困難は2つの方法で克服される。1つは統合マイクロ流体装置の構成の設計である。前述の米国特許出願第08/690,307号および第08/902,855号(これらは本願とともに共通に所有され、そして引用することによって本明細書の一部とされる)に記載されている装置および方法を使用することによって、汚染の問題を回避することが可能である。例えば、多数の並列のマイクロチャンネルの構成は高度に効率よい分離を提供する。第2の方法は生物学的実在物の収集について与えられた高度のコントロールを包含し、こうして、生物学的実在物と固体の支持体との間の個々のアフィニティー結合が切断(この切断は収集された生物学的実在物の再懸濁の前または後であることができる)された後、結合の切断を介してそのターゲットから選択的に解放される特異的レセプターにより結合された生物学的実在物のサブセットを除外して、粒子の第2収集はもとの混合集団の分離を生ずる。

【0064】

例えば、米国特許第5,646,001号(これは引用することによって本明細書の一部とされる)に記載されている方法と異なり、本発明は捕捉された生物学的物質の結合の破壊および付着に関連する物理化学的環境の選択されたコントロールおよび操作に限定されない。その代わりに、多重マイクロ流体構成は生物学的成分の混合物を分離する統合装置の設計における多数の柔軟性を提供する。こうして、頻度が大きく変化する混合細胞集団から生物学的実在物の多数のサブセットを単離すべき場合、双方のアプローチの組合わせを使用することができる。

【0065】

ここで第27図を参照すると、5つの異なる生物学的実在物(ここでは、決定因子として異なる細胞表面のレセプターを表す異なる細胞型)の混合物を4つの別々のサブセットに分離するために使用できる、本発明によるマイクロ流体装置における流路の構成が示されている。

分離装置および方法は、広い範囲の生物学的実在物の任意のものの効率よい単離を提供し、このような生物学的実在物はレセプターまたは他の特異的結合性物質と選択的に相互作用することができる試験試料または検体の成分であることが

できる。用語「生物学的実在物」は、本明細書において使用するとき、細胞、および細胞成分、例えば、膜、オルガネラ、およびその他、微生物、ウイルス、ならびに分子(例えば、タンパク質)および高分子(例えば、RNA、DNA およびPNA を包含する、核酸)を包含する、広範な種類の生物学的起源の物質を意味する。

【0066】

問題の生物学的実在物は、例えば、生物学的流体または抽出物、食物試料、環境的試料、およびその他を包含する、広範な種類の起源の試験試料または検体の中に存在することができる。

用語「決定因子」は、実在物の特質を同定または決定する、任意の特性を意味するために、本明細書において広い意味において使用される。前述の生物学的実在物のいずれかを言及するために使用するとき、決定因子は、選択的結合が起こるためにその存在が要求される、特異的結合性物質への選択的結合に関係しかつその原因となる生物学的実在物の部分を意味する。

【0067】

表現「特異的結合性物質」は、本明細書において使用するとき、問題の生物学的実在物上の特徴的決定因子を選択的に認識しかつそれと相互作用する、任意の物質を意味し、問題ではない生物学的実在物上に存在する決定因子を実質的に排除する。

アフィニティー結合の分離において使用される捕捉因子は、固体の支持体に結合させた、特異的結合性因子、またはレセプターを包含する。固体の支持体は静止しているか、あるいは移動性であることができる。有用な移動性固相は、例えば、ビーズおよび粒子を包含する。粒状固体の支持体は、磁場の適用によりターゲットサブセットの捕捉を促進する磁気材料から作ることが好ましい。

【0068】

一般に第27図に図解されているように構成され、かつそれを参照して記載されたマイクロ流体装置において、生物学的実在物の不均質混合物は、試料の構成成分の決定因子により特性決定されるように、下位集団に分離される。

試料における混合集団中の2 またはそれ以上の下位集団のサブセットを単離し

かつ精製するために使用するとき、方法は簡単であり、迅速であり、そして信頼性がある。対応する細胞表面の抗原に対して特異的な抗体は、複雑な混合物から特異的抗原を単離するための捕捉因子として働く。生物学的実在物の混合集団は下記のものを包含するが、これらに限定されない：細胞表面のレセプターを提示する全細胞、細胞表面のレセプターを担持する全細胞、可溶性レセプター、酵素、抗体、および特異的核酸の配列。したがって、細胞生物学、分子生物学、組織の型別、および微生物学を包含する、広範な種類の用途が可能である。

【0069】

第27図に示す統合装置は、例示の目的でマイクロチャンネルの4つの並列のネットワーク(A、B、C、およびDと表示する)で構成された重複流パターンを含む。多数の並列のネットワーク(4より多い)からなる高度に多重の構成は、理解されるように、本発明の範囲内に包含される。第15図の流れ構成に対する設計に類似して、各マイクロ流体ネットワークは、2つの入口および2つの出口の流路と流体連絡した、特異的捕捉因子(この場合において、固定化された抗体)を有する、捕捉チャンネル(または、「濃縮ゾーン」)を含む。ここでネットワークAを参照すると、入口および出口流路は、それぞれ、交差531および571において捕捉チャンネル541を接合する。一方の入口流路は試料入口溜502(これは全体の装置のための共通の入口として働く)、およびマイクロチャンネル504、506、および511により供給される。他方の入口流路は、ネットワークAに対して特異的であり、溶離緩衝液溜501およびマイクロチャンネル521からなる。一方の出口流路は共通の出口溜592およびマイクロチャンネル561、594および596からなる。他方の出口流路は、分析チャンネル551、出口溜591および検出ゾーン581からなる。

【0070】

アフィニティー捕捉、解放および検出を包含する、3段階の細胞単離プロセスは、第27図に概略的に図解されているように、生物学的細胞の複雑な混合物を多重流パターンの中に注入することによって開始される。入口溜および出口溜内に配置された適当な電極(第27図に示されていない)を横切る電位をコントロールすることによって、マイクロ流体装置上の試料の取扱いは動電学的に達成される。

濃縮ゾーン内で、細胞表面の特異的抗原を認識するチャンネル表面に固定化された抗体により、細胞は捕捉される。あるいは、細胞を捕捉するために、免疫磁性ビーズを使用することができる。この場合において、細胞の不均質懸濁液はビーズ表面上の特定の捕捉部分への特異的吸収によりターゲット(例えば、細胞表面の抗原に対する抗体)に結合する。次いで、濃縮チャンバーの側面に対するターゲットービーズ複合体の固定化は磁氣的に達成することができる。

【0071】

第27図に図解する装置を使用して、例えば、異なる結合特異性を有する4つの抗体を包含する捕捉因子に結合させたとき、6つの異なる細胞型の混合物を4つの明確なサブセットに分離することができる。この例において、A、B、C、およびDと表示する細胞表面の抗原に対する抗体を、それぞれ、チャンネル541、543、545、および547の中に固定化する。理解されるように、濃縮チャンネル541、543、545、および547の各々は、それに関連して、交差する入口および出口の流路および溜、分析チャンネルおよび検出ゾーンを有する。こうして、それらのそれぞれの表面抗原から発生するA、B、C、およびDと表示する細胞は、マイクロ流体ネットワークA、B、C、およびD内の前述のチャンネルの中に捕捉される。残りの細胞は装置を通過し、共通の出口溜592の中に収集される。次いで残りの細胞を下記においてさらに説明するように種々の用途において使用することができる。

【0072】

捕捉工程が完結すると、緩衝液溜(第27図に示されていない)内に含有される洗浄媒質を使用して固定化された細胞をすすぐことができる。次に、それらのそれぞれの濃縮ゾーンにおいて捕捉された単離された細胞を解放させ、次いで溶離緩衝液を動電学的に溜501、503、505、および507から、それぞれ、出口溜591、593、595、および597に送出すことによって検出ゾーン581、583、585、および587内で分析することができる。分析および特定の用途の要求に依存して、検出ゾーンは単に光学的検出器、例えば、蛍光検出器またはその他であることができるか、あるいはそれはそれ以上の流れ立体配置を表すことができる。最後に、本発明のこの態様は、試料混合物からターゲット生体分子を単離し、濃縮す

る好都合な手段を提供する。

【0073】

第27図に示すアフィニティー捕捉マイクロチャンネルは並列の立体配置であるが、単一の不均質濃縮ゾーンをアフィニティーチャンネルに固定化された複数のレセプター（例えば、この場合において、細胞表面の抗原に対して特異的な抗体）とともに選択的に使用することができる。不均質捕捉および解放法は、例えば、米国特許第5,646,001号(Terstappen et al.)（これはその全体において引用することによって本明細書の一部とされる）に記載されている。しかしながら、並列のアプローチの利点は、別々の均質な捕捉ゾーンが生物学的実在物に対する物理的衝撃を最小にすることである。生物学的実在物の混合集団の選択したサブセットを切断および／または解離するために要求されることがある、種々の溶離緩衝液および／または加熱サイクルに対して非常に感受性であることがある全細胞を使用して作業するとき、これは特に重要である。さらに、1つの捕捉因子を選択したターゲットサブセットに結合させる結合が他の捕捉因子をそれらのそれぞれの、選択したターゲットサブセットに結合させる結合から示差的に解離可能であり、こうして、そのターゲットサブセットからの1つの捕捉因子の解離がその選択したターゲットサブセットからの他の捕捉因子の解離を生じない場合においてのみ、複数のレセプターとともに単一の濃縮チャンネルを利用するアフィニティー捕捉法は可能である。こうして、物理化学的条件（例えば、イオン強度、pHおよび特定の切断因子の濃度）の正確な操作は、並列フォーマットの個々のマイクロチャンネルにおいて容易に達成される。生存可能な細胞を分離する本発明の装置および方法の他の利点は、マイクロ流体のプラットフォームにおいて、大きい気泡－生存可能な細胞の回収に対して有害である－が、細胞を操作する流体通路において生成しないことである。

【0074】

本発明のマイクロ流体装置および方法の他の有意な利点は、多重細胞分析の実施を細胞精製プロセスとオン・ラインで可能とする統合システムの能力を包含する。例えば、第27図に概略的に図解されているものに類似するポータブル自己含有マイクロ流体カートリッジを、後述するように、1パネルの試験の迅速な、定量的

かつ同時の測定のために、慣用の高勾配磁気的分離(HGMS)装置と並列に使用して、ヒトの疾患の診断および治療を促進することができる。HGMSに対する別のアプローチとして、大きい並列のチャンネルの構成を含むマイクロ流体をベースとする方法および装置は、統合された細胞の診断と組合わせて、経済的な、高い処理量の細胞精製法を提供する。さらに、この自動化プロセスは、慣用の細胞単離法と個となり、労働を必要せず、時間を消費しない。

【0075】

本発明は、また、試料から選択した細胞を消耗させるために統合マイクロ流体装置を使用する方法を包含する。骨髓、末梢血および／または臍帯血細胞の懸濁液から磁気的に標識化した細胞を除去するために、高勾配磁気的分離(HGMS)は使用されてきている。米国特許第5,514,340号および第5,691,208号(これらはそれらの全体において引用することによって本明細書の一部とされる)参照。HGMS法は典型的には強い磁場の中に微細な磁化性ワイヤのフィルターを配置することを含む。高勾配磁場をワイヤの回りで発生させて、磁化性ワイヤの上に非常に弱く磁性の粒子さえも捕捉することができる。

【0076】

米国特許第5,514,340号に記載されているHGMS装置と異なり、本発明は、移植のために骨髓、末梢血および臍帯血および／または造血組織から造血幹細胞／子孫細胞を回収する、マイクロ流体をベースとする細胞精製または細胞パージング装置および方法を包含する。現存するHGMS法は、通常、細胞の選択を達成するために3段階のプロセスを使用する。磁気的に複合化した抗体を使用して、細胞の混合集団中の所望の細胞を特異的にターゲティングする。次いで精製プロセスにおいて処理された非捕捉細胞を多数の目的、例えば、骨髓／幹細胞の移植に使用することができる。統合されたチップをベースとする細胞ソーティング装置および方法は下記の工程を包含する：1) 選択された細胞および細胞表面の抗原に対して特異的な抗体の貫流インキュベーション；2) 抗体と結合する表面活性化磁気ビーズの添加および引き続く他の貫流インキュベーション工程；3) ビーズ-抗体-細胞複合体をアフィニティー捕捉するための磁場の適用；および4) 複合体の磁気的解放または抗体-細胞表面の抗原の結合の化学的溶離／熱的解離。こ

の装置は混合集団から不必要な「選択された」細胞（例えば、T 細胞、腫瘍細胞またはオンコトープ）を消耗させるばかりでなく、かつまたさらに分析するために使用することができる。分析は下記のものを含むが、これらに限定されない：細胞の計数、細胞の染色、細胞のソーティング、細胞の溶解、遺伝的試験、競合結合および／または蛍光または他の同様な検出手段を使用する「サンドイッチ」アッセイ。これらのアッセイは、レセプター－リガンドのアフィニティー相互作用およびDNA ハイブリダイゼーション反応を特徴とする免疫診断における用途を有する。

【0077】

米国特許第5,081,030 号下記の文献に記載されているようなアフィニティーマトリックスからの細胞の解放、および、例えば、W096/31776号に記載されているような解放可能なコロイド状磁性粒子を使用する多パラメーター細胞分離は、それらの全体において引用することによって本明細書の一部とされる。

本発明は、米国特許第5,691,208 号に記載されているように、機械的弁の使用を必要としないで、流体回路の自動化電気活性化コントロールを実施する手段を提供する。動電学的ポンピングの方法および装置は、例えば、米国特許出願第08/615,642号、1996年3月13日提出（代理人の整理番号A-63054-4）（その開示はその全体において引用することによって本明細書の一部とされる）に記載されている。

【0078】

段階特異的抗原または未熟ヒト骨髓細胞および／または多能性リンパ造血幹細胞を認識するモノクローナル抗体を、例えば、米国特許第4,714,680 号（これはその全体において引用することによって本明細書の一部とされる）に記載されているように使用することができる。

理解されるように、例えば、上記において、第20図に示すように、3 またはそれ以上の出口溜を設ける場合、アフィニティー捕捉および解放を実施することができ、ここで下流の溜の1 つは精製されたまたはプロセッシングされた試料混合物を収集する。選択された第2 または競合結合対を導入して問題の結合した実在物を解放するために、例えば、第14図に示すように、追加の入力溜を濃縮チャンネル

ルまたはアフィニティーゾーンから上流に設けることができる。

【0079】

本発明の装置は、選択された細胞、例えば、抗体、好ましくはモノクローナル抗体により認識される細胞表面の抗原を発現する細胞を試料から消耗させるために使用することができる。本発明の1つの態様において、この方法を使用して、血液および骨髄から得られた細胞懸濁液から選択された細胞を消耗させる。特に、この方法を使用して、自家移植のために収集した骨髄または血液の試料から腫瘍細胞を消耗させるか、あるいは同種異系移植のために収集した骨髄または血液の試料からTリンパ球を消耗させることができる。また、本発明の装置を使用して、試料からウイルス粒子を除去することができる。

【0080】

本発明の装置および方法は、骨髄、臍帯血および全血を包含する生物学的試料のプロセッシングにおいて使用することができる。

本発明の装置および方法は、移植ならびに当業者にとって容易に明らかである他の療法において使用するための造血細胞調製物を製造するために、試料から腫瘍細胞またはTリンパ球を消耗またはパージするために好ましく使用される。例えば、自家移植の場合において、骨髄をリンパ腫または他の悪性腫瘍を患う患者から収集することができ、本明細書に記載する装置および方法を使用して試料から腫瘍細胞を実質的に消耗させ、そして得られる造血細胞調製物を療法において使用することができる。また、同種異系移植の場合において、骨髄または血液をドナーから収集し、そして本明細書に記載する方法によりTリンパ球を消耗させることができる。

【0081】

本発明の方法を使用して、造血細胞の高度に精製された調製物を回収することが可能である。特に、もとの試料の中に存在した造血細胞の50%より多くを含有し、もとの試料の中のTリンパ球または腫瘍細胞が2対数より大きく消耗した、造血細胞調製物を得ることができる。調製物中の造血細胞は抗体でコーティングされていないか、あるいは変性されていず、移植ならびに当業者にとって容易に明らかである他の療法において高度に適当である。

【0082】

本発明の方法および装置は、また、試料、例えば、血液および骨髄から赤血球を除去するために使用できる。正常血液の体積の半分は成熟赤血球から成る。典型的には、これらの細胞は有核細胞よりも>100倍多い。多数の臨床的および研究用途のために、慣用法、例えば、フィコールハイパーク (Ficoll-Hypaque) 密度遠心分離よりも高い細胞の回収率で赤血球を除去できる。

【0083】

本発明の特定の用途において、白血球下位集団の診断的フローサイトメトリーのために本明細書に記載する方法および装置を使用して、試料を処理することができる。例えば、この方法を使用してヒト免疫不全ウイルス (HIV) ウイルスで感染した患者の血液試料を調製して、このような患者におけるリンパ球の集団をモニターすることができる。慣用の免疫蛍光測定およびフローサイトメトリーによる白血球の下位集団の絶対数の計数は末梢血中の赤血球の豊富な存在により複雑であり、結局、このような計数は有核細胞の数および免疫表現型の別々の測定から最もしばしば誘導された。免疫表現型の測定のために細胞から赤血球を除去するために、種々の手法が提案され、使用されているが、これらの手法は労働を必要とし、自動化が困難であり、ある場合において、手法それ自体は免疫蛍光の測定を妨害することがある。対照的に、本発明は、血液試料から赤血球を除去する、遠心または洗浄工程を必要としないで、容易に自動化することができる、効率よい、直接的方法を提供する。

【0084】

本発明を利用できる特定の例は次の通りである：移植片／宿主疾患 (GVHD) を予防するための本発明の装置を使用する同種異系骨髄からの CD3+T 細胞の消耗；B リンパ系悪性腫瘍の患者における造血子孫細胞の単離および悪性細胞の消耗；骨髄からの CD45RA+ リンパ腫細胞の除去；末梢血および骨髄からの乳癌細胞のパーキング；CD34- 細胞の免疫磁氣的除去による CD34+ 細胞の精製；血統マーカーを発現するネズミ細胞の消耗；赤血球の免疫磁氣的除去；細胞の診断一試験のマイクロ流体をベースとするパネルを使用する；母性血液からの胎児有核赤血球の単離；遺伝的に修飾された造血幹細胞の単離および非造血由来の悪性細胞の消耗一例

例えば、遺伝子療法のための；造血細胞系統の選択された細胞集団の単離および計数；移植のための移植片の操作；特異的配列をもつプローブにより認識されるDNAの捕捉および引き続くDNAの選択的解放；AFLP分析；免疫解放を使用するDNA配列決定産物の固相の試料のクリーンアップ（デスビオチン蛍光体）；およびその他。

【0085】

ある態様において、二次流路および主電気泳動流路の交差から下流の濃縮された画分と1またはそれ以上の試薬を組み合わせることが望ましいことがある。第20図は第15図に示すものに類似するフローダイアグラムである。第20図において、試薬流路300は1またはそれ以上の試薬を溜301から主電気泳動流路238に運搬し、ここで試薬を濃縮された画分中の1またはそれ以上の分析物と組み合わせることができる。そして、理解されるように、主電気泳動流路が二次電気泳動流路との交差から分岐している場合、分岐において下位画分が産生し、各々のこのような下流の分岐は溜から試薬を運搬する試薬流路を有することができる。このような構成は、単一の試薬による下位画分の反復処理、または異なる試薬による各下位画分の処理、または2またはそれ以上の試薬による下位画分の同時の処理を提供することができ、各々は濃縮された下位画分中の1またはそれ以上の分析物との相互作用の特に望ましい結果を産生する。

【0086】

第21図および第22図は第16図および第17図に示すものに類似するフローダイアグラムであり、多数の分岐した主電気泳動流路を有し、各分岐はアフィニティゾーンを有する。第21図において、試薬流路300は1またはそれ以上の試薬を溜301から主電気泳動流路238に運搬し、ここで試薬を濃縮された画分中の1またはそれ以上の分析物と組み合わせ、それと反応させることができる。この態様において、試薬流路300は第1分岐から上流の点において主電気泳動流路238と交差するので、溜301により供給される試薬はすべての下位画分を反復処理し、これらの下位画分は下流の分岐において処理され、それぞれのアフィニティゾーンにおいて検出される。第22図において、主電気泳動流路238の下流の分岐の各々は試薬流路(302、304、306、308)を有し、試薬流路の各々は試薬を別々の試薬

溜(303、305、307、309)から試薬を運搬する。このような構成は下位画分の異なる処理を提供し、例えば、並列のハイブリダイゼーションゾーンの独立のストリンジェンシイのコントロールを提供する。

【0087】

例えば、第18図～第22図におけるように、流路を提供する装置、またはこれらの組合わせは、DNAのプロファイリングに使用することができる。さらに詳しくは、例えば、第22図に示すように、溜303、305、307、309において複数の異なる単一遺伝子座RFLPプローブを使用することによって、制限フラグメントの多形性(“RFLP”)の分析を実施することができる。多数のプローブを並列に走行させることによって、得られるアレレの分布は急速かつ代表的なDNAプロファイルを生ずると同時に、ランダム合致の可能性を有意に最小にする。

【0088】

1 またはそれ以上の電界を媒質に印加して媒質を通して実在物を動かす種々の用途において、本発明の装置を使用することができる。代表的な用途の例は、電気泳動的分離の用途、核酸のハイブリダイゼーション、リガンドの結合、調製の用途、配列決定の用途、合成の用途、分析物同定の用途、例えば、臨床的、環境的、品質のコントロールの用途、およびその他である。こうして、特定の用途に依存して、種々の異なる流体試料を本発明の装置の中に導入し、ここで代表的な試料は体液、環境的流体試料、例えば、水およびその他、または特定の分析物の同定および／または単離を望む他の流体試料を包含する。特定の用途に依存して、種々の異なる流体試料は重要であることがあり、薬剤、トキシン、天然に存在する化合物、例えば、ペプチドおよび核酸、タンパク質、糖タンパク質；有機および無機のイオン、ステロイド、およびその他を包含する。臨床的用途における本発明の装置の使用は特に重要であり、ここで分析できる試料は血液、尿、血漿、脳脊髄液、涙、鼻または耳の排出物、組織のライゼイト、唾液、眼の引掻き物、微細な針のバイオプシー、およびその他を包含し、ここで装置の中に導入する前に、試料を再処理すること、すなわち、溶媒と組合わせて粘度を減少させ、イオン強度を減少させるか、あるいは溶解度または緩衝液を特定のpHに増加すること、およびその他を必要とすることがある。臨床的用途のために、問題の分析物

は、アニオン、カチオン、小さい有機分子、例えば、薬剤または生体内異物の代謝物質、ペプチド、タンパク質、糖タンパク質、オリゴ糖、オリゴヌクレオチド、DNA、RNA、脂質、ステロイド、コレステロール、およびその他を包含する。

【0089】

下記の実施例により、本発明を詳細に説明する。これらの実施例は本発明を限定しない。

例1

水性試料中の有機分析物の高い効率の分離

第4図に示すようなカードを次のようにして装置と組み合わせて水性試料中の有機分析物の分離において使用する。この装置はカードの各溜の中に電極を導入することによって適当な電界を印加し、そして分析物が検出領域65を通過するとき、分析物を分析する手段を提供する。カード50において、濃縮チャンネル62はC-18相でコーティングされた多孔質ビーズからなるが、不要流体の溜を除外する、溜およびチャンネルは20mMのホウ酸塩緩衝液からなる。100mlの水性試料を濃縮チャンネル62の中に界面66を通して注入された。試料中の実質的にすべての有機分析物はC18でコーティングされた多孔質粒子に可逆的に結合するが、残りの試料成分は濃縮チャンネル62の中から外に流れて不要物溜63の中に入る。次いで10mlの溶離緩衝液（90%のメタノール／10%の20mMのホウ酸塩緩衝液pH8.3）を界面66を通して濃縮チャンネル62の中に導入し、これにより可逆的に結合した有機分析物は溶離緩衝液の中に遊離するようになる。使用する緩衝液の体積は小さいので、もとの試料中の分析物濃度に比較して溶離緩衝液の体積中の分析物濃度は100～1000倍に増加する。次いで溜57および56の上のシールを除去し、電極61および60の間に電界を印加し、57の中に存在する緩衝液を56に向けて動かし、ここで緩衝液の前面の動きは濃縮された分析物からなる溶離プラグを交差51へ動かす。次いで電極58および59の間に電圧勾配を印加し、溶離緩衝液の体積の中に存在する分析物の狭いバンドを分離チャンネル52を通して動かし、有機分析物を高い効率で分離する。

【0090】

また、上の実験を第4図に描写されている装置の変更されたバージョンで実施

する。変更された装置において、溜57に加えて、装置はまた濃縮チャンネル62と流体連絡している溶離緩衝液の溜を含む。この実験において、試料を濃縮チャンネル62の中に導入し、これにより溶離緩衝液の中に存在する有機分析物は濃縮チャンネルの中に存在するC18 相でコーティングされたビーズに可逆的に結合する。10mlの溶離緩衝液を濃縮チャンネルを通して移動させ、可逆的に結合したあらゆる有機分析物を解放させるために十分な短い時間の間、溶離緩衝液溜の中に存在する電極と電極60との間に電界を印加する。溶離緩衝液が濃縮チャンネルの中に動いた後、電極61および60の間に電圧勾配を印加し、緩衝液を57から56に動かし、前述したように、この緩衝液は定められた体積の有機分析物を含む溶離緩衝液を交差51に動かす。

【0091】

例2

統合マイクロ流体装置内の濃縮のために常磁性ビーズを使用する試料の濃縮

本発明の態様として、生物磁気的分離に基づく実験のプロトコルを提供する。一般的に第23図に図解し、かつそれを参照して記載したように構成されたマイクロ流体装置において、アフィニティー媒質でコーティングされた磁気ビーズで特定のターゲットから構成された粗製試料を処理して、特異的アフィニティー媒質に対して結合アフィニティーを有するターゲットを捕捉する。このような磁気ビーズは、例えば、Dyna1, Inc. (New York) から名称Dynabeads (登録商標) で市販されている。Dynabeads は抗体またはターゲットに選択的に結合する他の結合性成分でコーティングされた、超常磁性、単分散ポリスチレン微小球である。ターゲットは細胞、遺伝子、細菌、または他の生体分子であるか、あるいはそれらを包含することができる。次いでターゲット-Dynabead 複合体を磁石により単離する。得られる生物磁気的分離手順は簡単、迅速でありかつ信頼性があり、ここでDynabeads は複雑な不均質な生物学的混合物から特異的ターゲットを単離するための一般的濃縮媒質として働く。本発明によれば、このような磁気的濃縮媒質は、例えば、細胞生物学、分子生物学、HLA 組織型別、および微生物学を包含する広範な種類の用途において使用することができる。2 つの例示的な例、詳しくは、DNA 精製および細胞単離の方法がここにおいて提供される。

【0092】

第1 に、マイクロチャンネルをベースとする装置を一般的に記載し、次いで生物磁気的分離のためにDynabeads を使用する方法を一般的に記載する。

例えば、第23図に示すような、統合マイクロ流体装置は、濃縮チャンネル382 にカップリングされた主電気泳動流路394 を含む。濃縮チャンネル382 は固相抽出(SPE) チャンバー380 を含み、そして下流の不要流体の溜391 に接続されている。主電気泳動流路は、濃縮された試料検出領域393 および流体出口溜395 から成り、T字形交差388 において二次電気泳動流路384 と結合する。この構成において、洗浄373 および溶離375 緩衝液のための入口溜および出口溜391 および395 内に配置された適当な電極を横切る電位をコントロールすることによって、試料の取扱いを動電学的に達成される。

【0093】

Dynabeads および次いで問題の試料を、それぞれ、注入口379 および377 を通して装置の中に導入する。濃縮チャンネル内で、試料および所定のターゲットに対して特異的なDynabeads の不均質懸濁液インキュベートして、ビーズの表面上の特定の捕捉部分への特異的吸収によりDynabeads をターゲットに結合させる。濃縮チャンネル380 の側面へのターゲット- ビーズ複合体の固定化は磁気的に達成される。希土類の永久磁石を濃縮チャンネルに隣接させて配置することによって、これは手動的に可能である。本発明の他の態様において、電磁手段を使用する自動化プロトコルを使用して、SPE チャンバーに付与される加えた磁場をコントロールする。

【0094】

磁気的固定化工程が完結したとき、洗浄緩衝液溜373 内に含有される洗浄媒質を通路374 を介して濃縮チャンネル380 の中にかつそれを通して動かすことができる。試料のすすぎの間に、不要流体は濃縮チャンネル380 の中から外に電気泳動流路384 を経由して、次いでT字形交差388 を過ぎて、排出口392 を通して離れる方向に不要流体の溜391 に行く。こうして、主濃縮チャンネル394 に不要流体を通過させないで、洗浄工程からの上清はシステムから除去される。本発明のこの態様は、最初に検出領域393 を汚染させないで、粗製試料からターゲット生

体分子を単離しかつ濃縮するための好都合な手段を提供する。

【0095】

例3

全血からのDNA 精製

第23図に概略的に表示されている電気泳動マイクロ装置を使用する実験的方法を準備し、ここで全血からゲノムDNA を抽出しかつ精製する濃縮媒質として、Dyna1(登録商標) 生物磁氣的のビーズを使用する。血液源はスライド上の小さい乾燥した法医学的試料(例えば、ナノグラムのオーダー)、新しく抜き出した動脈の血液のアリコート(10ml 程度に少ない) または骨髓(ほぼ5ml)であることができる。増幅および分析のために、あるいは増幅しないで直接的に分析するためにDNA のアリコートを生ずるように、第23図の装置で全血を処理する自動化手順を証明する目的で、迅速なDNA の単離および溶離に適用可能なプロトコルを準備する。

このプロセスは下記の工程を包含する：

1. 試薬および試料の装入；
2. 細胞の溶解／DNA の捕捉；
3. 反復的DNA の洗浄；および
4. DNA の溶離。

【0096】

これらの工程の各々をここでより詳細に論ずる。

商業的に包装された試薬を使用するこの態様について、試薬および試料における差を収容するように特別に設計された注入口により、生物磁氣的媒質、溶解溶液および試料を装入する。溶解溶液および磁気ビーズを含む、Dyna1 DIRECT(商標) 試薬を、まず、マニュアル注入口679 を介して固相抽出チャンバー380 の中に直接注入し、次いで注入口377 を介して血液試料をSPE チャンバーの中に手により注入する。あるいは、他の商用試薬を使用することができ、ここで核溶解溶液およびビーズはキットとして一緒に包装されていず、その代わり別々に供給される。この場合において、溶解溶液を入口溜371 からSPE チャンバー380 の中に動電学的に装入することができる。次に、磁気ビーズ(例えば、Japan Synthetic Rubberにより供給される)を、注入口379 から装入するか、あるいは入口溜36

9 から動電学的に装入する。後者のアプローチにおいて、流路384 中のSPE チャンバーのちょうど下流に配置された電磁捕捉手段、機械的手段(例えば、膜、メッシュスクリーン、またはアガロースゲルのプラグ) または双方により、ビーズはチャンバーに閉じ込められる。いったんチャンバーがビーズおよび溶解溶液で充填されると、注入口377 を介して、あるいはチャンバーから下流の電極との電極対を有する試料入口溜を介して動電学的に、DNA 試料は添加される。

【0097】

濃縮チャンバー内で、血液試料、溶解溶液およびDynabeads を5 分間インキュベートし、その間に細胞は溶解する。次いで解放された核酸を微小粒子の表面上に固定化された捕捉部分に吸収させてDNA-ビーズ複合体を形成することができる。細胞の溶解を増強するために、例えば、ビーズ、試料、および溶解溶液の流れが合同するように、供給チャンネルを配置することによって、混合を達成することができる。印加電界の賢明なコントロールにより、混合を動電学的に増強することができる。それぞれ、入口溜371 および出口溜391 の中に配置された電極の極性を周期的に逆転させることによって、SPE チャンバー内で振動的方法で血液-溶解緩衝液の混合物を動電学的に動かすことができる。細胞に加えられる機械的剪断をさらに増加するために、SPE チャンバーのハウジングの中に開口様構造を形成することができる。

【0098】

磁氣的単離が達成され、SPE チャンバーの側面へDNA-ビーズ複合体が捕捉された後、溜373 の中に含有される洗浄緩衝液をチャンバーを通して外に不要流体の溜391 へ動電学的に輸送して、すすぎを達成する。この45秒のすすぎ後、磁場の解放によりビーズを溶液の中に再懸濁させ、次いで洗浄緩衝液中で1 分間インキュベートする。同一のプロトコルに従い、すすぎをさらに2 回反復し、細胞ライゼイトおよび上清を各洗浄工程からシステムの外に取出す。ここでPCR インヒビターを包含する、不要流体を主電気泳動チャンネル394 に通過させる必要はない。

【0099】

精製プロセスの最終工程はDNA の溶離である。再び、DNA が結合した捕捉ビー

ズを電磁的に固定化した後、溶離緩衝液を溜373 からSPE チャンバーに動電学的に輸送する。定量的溶離を得るために、緩衝液がチャンバーを通過せず、こうして精製されたDNA が早期に洗浄除去されないように、電極の電位を正確に操作することが必要である。あるいは、D.Benvegnu他、米国特許出願第08/878,447号、1997年6月18日提出の文献に記載されているように、注入クロス(第23図に示されていない)を使用することによって、溶離緩衝液のプラグをチャンバーの中に動かすことができる。SPE チャンバーの中に溶離緩衝液を存在させ、磁場を解放し、次いで溶離緩衝液を2分間インキュベートして有限のDNA 脱着反応速度を可能とすることによって、ビーズを再懸濁させる。DNA の溶離が完結したとき、ビーズをSPチャンバーの中に動電学的に固定化し、そして精製されたDNA を分析のためにプラグとして主電気泳動チャンネル394の中に動電学的に注入する。検出領域395は苦心して作られたマイクロ流体システム(第23図に示されていない)を表すことができ、これは、なかでも、制限酵素消化、プロットハイブリダイゼーション、例えば、サザンおよびスロット/ドットプロット、電気泳動フラグメントサイジング、および定量的PCR 分析のために、複数のマイクロチャンネルから構成することができる。しかしながら、本発明のこれらの態様はそれ以上この実施例において説明されない。

【0100】

要約すると、前述のプロトコルは、いったん粗製試料がマイクロ流体装置の中に導入されると、10分より短時間で、ユーザーの関与なしに、精製されたDNA のPCR に直ぐに使用されるアリコート単離を可能とする。この方法の他の利点は、多い労働または遠心工程を必要しないことに加えて、所定の実験において使用される試薬の量が最小であること、およびその他である。

【0101】

例4

免疫磁気的単離を使用する細胞の濃縮

Dynal(登録商標)生物磁気的ビーズを細胞ターゲットの単離のための濃縮媒質として使用する、実験のプロトコルを準備する。この手順は前述のDNA の精製手順に類似する。例3におけるように、常磁性微小粒子の表面上に固定化された特

異的結合部分でコーティングされたビーズで、ターゲットを選択的に捕捉する。

Dynabeads は入手可能であり、次のようにして、種々の形態に調製される：

1. 多数のヒト細胞マーカー、例えば、T 細胞、T 細胞サブセット、B 細胞、単球、幹細胞、骨髄性細胞、白血球およびHLA クラスII陽性細胞に対する、アフィニティー精製されたモノクローナル抗体で前コーティングする；
2. 齧歯類のB 細胞、T 細胞およびT 細胞サブセットを単離するために、マウス、ラット、またはウサギ免疫グロブリンに対する二次抗体でコーティングする；
3. 任意の所定の生体分子でカスタムコーティングするための、非コーティングまたはトシル化形態；または
4. ビオチニル化抗体とともに使用するためのストレプトアビジンでコーティングされた形態。

【0102】

一般的に第23図に図解するように構成されたマイクロ流体装置において、動電学および磁気的操作法を使用して、細胞の不均質懸濁液を処理して、それ以上のプロセッシングおよび分析のために細胞の精製されたアリコート調製する。SPE チャンバーに付与された磁場の電磁的コントロールを使用して、生物磁気的分離はマニュアル的に、あるいは自動化フォーマットで可能である。本発明の代表的態様として、下記の4 工程のプロトコルを準備する。

【0103】

1. 生物磁気的分離媒質を包含する、ターゲット細胞および試薬を装入する：
注入口379 を介して直接的に、あるいは所定のターゲットに対して特異的なDynabeads の溶液を含有する入口溜371 から動電学的に、磁気ビーズの溶液をSPE チャンバー380 の中に装入する；あるいは試料注入口377 によりDynabeads の溶液で充填されたSPE チャンバーに試料を直接添加する。

【0104】

2. 特異的ターゲットに結合することができるDynabeads を使用する細胞の捕捉：

試料およびビーズをSPE チャンバー内で2.5 分間インキュベートし、動電学的

混合工程を使用して吸着を増強し、ターゲット細胞はDynabeads に結合してターゲット- ビーズ複合体を形成する。

【0105】

3. ターゲット- ビーズ複合体を固定化することによってターゲット細胞を洗浄する：

結合したターゲットを含有する捕捉ビーズを電磁的に固定化し、動電学的操作により洗浄緩衝液ですすぐ：

洗浄緩衝液が入口溜373 からSPチャンバーを通して不要部分の出口391 に行

くように、電極電位をコントロールすることによって上清を除去し、

45秒後、流れを停止し、磁場の解放によりターゲット- ビーズ複合体を溶液の中に再懸濁させ、

洗浄緩衝液中でターゲット- ビーズ複合体を1 分間インキュベートし、

上記洗浄工程をさらに2 回反復する。

【0106】

4. Dynal のDETHaBEAD0試薬を用いるターゲット細胞溶離：

捕捉ビーズを電磁的に固定化し、DETHaBEAD0（商標）溶液をSPチャンバー380 の中に装入する：

電極電位の操作によりDynal 抗体をベースとする試薬を溶離緩衝液溜373 から動電学的に動かして、溶離緩衝液がチャンバー通過するのを回避するか、あるいは注入クロス（第22図に示されていない）を使用して溶離緩衝液のプラグをSPチャンバーの中に注入することができ、

磁場の解放によりビーズを再懸濁させ、

溶離緩衝液中の懸濁したビーズを2 分間インキュベートして、有限の脱着の反応速度を可能とし、

ターゲットの溶離が完結したとき、ビーズを電磁的に固定化し、

単離されたターゲット細胞をそれ以上の処理および分析のためにSPE チャンバーから主電気泳動チャンネルの中に動電学的に輸送することができる。

【0107】

マイクロ流体装置および方法を使用する細胞の分離は、慣用のフローサイトメト

リー技術に対してコスト的に魅力的な別法を提供する。さらに、生物磁気的分離技術と組み合わせるとき、マイクロ流体装置は感度が増加しかつバックグラウンドのノイズが減少した、細胞の濃縮および検出を可能とする。マイクロ流体をベースとする磁気的単離法はターゲット物質を最小のストレスに暴露し、したがって、細胞を無傷および生存可能なままにし、ポリメラーゼ連鎖反応の増幅(RT-PCR)とカップリングさせた逆転写反応において直接的にそのまま使用可能とする。マイクロ流体をベースとする方法はフェノール抽出、エタノール沈降、または遠心を使用せず、毒性試薬をほとんど使用しない。分離は高価な装置を使用しないで可能であり、高度に計れる。

【0108】

例5

コスト的に有効な疾患管理のための道具

遺伝子療法はベンチからベッドサイドに動くので、療法および診断はいっそう緊密に相互に連結するようになるであろう。結局、ベッドサイドにおいて生物計器を使用してDNAをベースとする薬剤の効能をモニターすることは、これらの治療を成功に導くためにきわめて重要となるであろう。さらに詳しくは、DNAを増幅および検出する出現しつつある分子的方法を細胞の収集および単離プロセスと統合するマイクロ流体をベースとする装置は、この市場の要求を扱うために大きい有望性を保持する。こうして、本明細書(特に例3および4)に記載する方法を組み合わせることによって、1つの分析機器において、医師を助ける原価効率的な疾患の予後およびモニターが可能であることは、所定の遺伝子療法の適当性の評価を可能とする。このような有効な疾患の管理の戦略は、他の遺伝薬理学のアプローチに加えて、ポスト・ゲノム時代急速アプローチ(post-genomic era rapidly approaches)としての広い使用の可能性を有する。

【0109】

本発明の態様を説明液体試料目的で、血液をベースとする疾患を管理するシステムを提供する。

バックグラウンドの目的で、遺伝的血液性疾患はヒトに影響を与える最も普通の遺伝病である。世界健康機構(World Health Organization)は、世界の人口の

約5 %が異なる型のヘモグロビンのキャリアーであること、そして約300,000 の新しい症例が毎年診断されることを推定する。鎌状赤血球貧血および β 地中海貧血は、遺伝子療法を使用して治療することができる、2 つの最も普通の異常ヘモグロビン症である。

【0110】

造血幹細胞の収集および単離は、異常ヘモグロビン症の治療、ならびにそれらの治療のモニターにおいて特に重要である。第22図に示すようなマイクロ流体装置の使用を、例4に記載されているようなヒト造血子孫細胞の選択のためにDynal試薬の使用と組み合わせるとき、所望の幹細胞の単離を達成する、迅速な、使用が簡単な方法が可能である。例えば、1ml のDynabeads M-450 CD34はほぼ 8×10^7 細胞を単離するであろう。100ml(1 単位) のDETACHaBEAD CD34を使用して、 4×10^7 (100ml)のDynabeads M-450 CD34を分離する。このプロゲニター・セル・セレクション・システム(Progenitor Cell Selection System)で単離された細胞は純粋であり(骨髓から95%、末梢血および臍帯血から90%)そして表現型的に変更されていない。同一装置で、いったん幹細胞が単離され、次いで溶解されると、分子遺伝的方法を使用して、遺伝子の発現のモニターを包含する、DNA 分析が可能である。こうして、本発明のこの態様に記載されているような、マイクロ流体をベースとする生物分析装置および方法は、この出現する分子薬物および診断のインターフェースにおいて疾患の管理のための価値の知れないほどの道具であることを証明するであろう。

【0111】

例6

固相単離および濃縮

本発明の下記の態様において、ターゲット特異的微小粒子の選択的表面の性質およびSPチャンバー内にビーズを保持する機械的手段を使用することによって、不均質混合物からの特定のターゲットの固相抽出(SP)は達成される。商用試薬は広範な種類の生物研究の用途のために容易に入手可能であるので、生物磁気的分離法は現在魅力的であるが、匹敵する分離を達成する他の非磁気的マイクロ流体をベースとするアプローチは可能である。上記態様に類似する態様において、ミク

ロ流体のフォーマットの固相の態様が提供される。機械的手段、例えば、濾過膜またはメッシュスクリーンを利用して、ターゲット特異的結合性部分を有するビーズを濃縮チャンバー内に保持することができる。さらに、アガロースゲルを(実験の前に不要流体の溜391 から) チャンネル384 の中に濃縮チャンバー380 の出口において注入して、ビーズが逃げるのを防止し、しかも洗浄緩衝液および溶離緩衝液を高度に多孔質媒質に通過させることができる。こうして、複雑な混合物からターゲットを単離しかつ精製する例2 に記載する態様の各々を、少なくとも概念的に、磁場の使用を必要としないで、達成することができる。

【0112】

例7

この例において、アフィニティー結合の捕捉および解放を使用して、試料中の問題の生物学的実在物を収集し、次いで解放し、分離する。

ここで生物学的実在物をアフィニティー結合の対の1つのメンバーに結合させ、そして固体支持体上の他のメンバーを使用するアフィニティー結合により濃縮ゾーンにおいて捕捉する。次いで濃縮された捕捉された生物学的実在物を、例えば、より高いアフィニティーを有する結合対のメンバーにより結合対の競合的置換により、解放させる。

【0113】

特に、例えば、問題の生物学的実在物はDNA であることができる。一般に、この方法は次のようにして進行する。アフィニティー結合対の1つのメンバーを選択されたオリゴヌクレオチド配列決定プライマーの5'末端に結合させ、ここでプライマーは約10〜30塩基、通常約15〜25塩基、または約20塩基の長さであり、機能化されたプライマーを形成する。問題のDNA を機能化プライマーとヌクレオチドの存在下にプライマーのエクステンションに好適な条件下に組合わせて、問題のDNA に対して相補的なDNA を形成し、そしてDNA の特異的部分を増幅する。増幅されたDNA 部分の蛍光検出のための発色団を提供する理由で、色素のターミネーターを使用することができる。各生ずる増幅されたDNA は各鎖の5'末端に官能基を有し、そして発色団を担持する。この配列決定反応は装置の外側で実施することができ、そして増幅されたDNA を入口を經由して濃縮チャンバーの中に導入

することができるか、あるいはこの反応を装置それ自体で実施することができる。

【0114】

次いで結合対の他方のメンバーを固体表面に結合させ、こうして、結合対のメンバーのアフィニティー結合に好適な条件下に、機能化DNAを固体表面と接触させるとき、DNAは固相上に捕捉される。本発明によれば、固相は粒子またはビーズであることができ、それらはそれら自体装置のチャンネルまたはチャンバーの中へ、それらの内部に、それらから外に存在するように操作することができる。

【0115】

次いで有意により高いアフィニティーを有する結合対のメンバーを導入することによって、捕捉されたDNAを解放させ、その結果そのメンバーは機能化DNA上の結合対のメンバー、または固体の支持体上の結合対のメンバーと置換する。これにより、問題のDNAは遊離し、次いで濃縮チャンネルの中から外に分離チャンネルへ流れることができる。

【0116】

種々のアフィニティー結合対の任意のものを使用することができる。例えば、アビジン-ビオチン系を使用することができる。アビジンを固体の支持体に結合させ、そして非修飾ビオチンよりもアビジンに対するアフィニティーが有意に低い、修飾されたビオチンをオリゴヌクレオチドプライマーに結合させる。増幅を実施し、次いで修飾されたビオチンを固体の支持体上のアビジンに結合させることによって、増幅されたDNAを装置の中に捕捉する。次いでビオチンを濃縮チャンネルの中に導入して修飾されたビオチンを置換することによって、DNAを解放させ、DNAを濃縮チャンネルから取出す。

【0117】

例示的实施例において、機能化オリゴヌクレオチドプライマーはM13/pUC前方23塩基の配列決定プライマーであり、5'末端にデチオビオチンが結合されており、下記の配列を形成する：

デチオビオチン-5'-CCCAG TCACG ACGTT GTAAA ACG-3'

デチオビオチン分子をオリゴヌクレオチドに結合させる一般的方法を第26図に

示す。簡単に述べると、第26図に示すように、N-ヒドロキシスクシンイミドドデオリオビオチン(K. Ilfmann et al. (1982), Biochemistry, Vol. 21, p. 978) (0.1mM) を5'アミノ-修飾剤C6T(Glen Research; 0.1M)と反応させてデチオビオチンを形成した。デチオビオチン機能化プライマーを調製するために、DNA合成装置によるオリゴヌクレオチド合成の最後の工程においてデチオビオチンアミダイト(第26図において[2])を使用することによって、デチオビオチンを導入した。固体の支持体から切断し、そして塩基保護基を除去した後、デチオビオチン結合プライマーを配列決定反応において使用した。

【0118】

増幅後、増幅されたDNAはDNAの各鎖の末端にデチオビオチン官能基を含む。ここで第24図を参照すると、試料中のDNA配列決定産物を試料入口437に添加することができる。フィルターまたは膜材料を入口の下部に位置させて、試料濃縮チャンネル431内に閉じ込められた試料濃縮媒質432からの粒状物質のアクセスを制限することができる。好ましくは、装置を構成するチャンネルは装置の平面内に位置するが、試料を装置の平面の外側から(例えば、上から)導入し、そして処理された試料および/または不要流体は任意の次元から濃縮ゾーンを去ることができる。第24図および第25図に示す態様において、処理された試料は装置の平面より下において不要流体出口433を通して濃縮ゾーンを去る。すべての溜435、436、434、438、440は緩衝液を含有するが、溜435はさらにビオチンを10mM~1000mMの範囲の量で含有する。入口437と不要流体出口433との間に圧力勾配を加えることによって、濃縮ゾーンを通る流れをコントロールすることができる。あるいは、試料入口と不要流体の溜との間に電界を印加することによって、濃縮ゾーンを通して試料を移動させることができる。ビーズまたは粒子をタンパク質カルボキシアビジンでコーティングし、タンパク質カルボキシアビジンはデチオビオチンに対して強いアフィニティーを有し、したがって、試料のその成分を選択的に濃縮するであろう。溜436と433または438のいずれかとの間に電位を印加することによって、濃縮ゾーンをすすぐことができる。DNA試料の捕捉後、溜435および438の間に電界を印加することによって、溜435の中に位置するビオチンを濃縮ゾーンを通して動かす。ビオチンはデチオビオチンよりも有意

に大きいアフィニティーをカルボキシアピジンに対して有し(ビオチンについて $K_d=10^{-15}$ M/デチオビオチンについて 10^{-11} M) 、結局ビオチンは問題のDNA を濃縮ゾーン中のビーズから置換させる。溜435 および440 に対して約5 秒間電界を切り換えることによって、解放されたDNA を主電気泳動チャンネル441 の中に注入する。これにより、解放されたDNA の一部分は分離チャンネル441 内の分離媒質の中に移動する。434 および440 の間の電界を変化させると、主電気泳動チャンネル中のDNA は分離される。この分離は光学的検出器439 において検出される。

【0119】

濃縮チャンネルから下流のチャンネルの配置が異なる、別の態様において、代表的なサンプリングが主分離チャンネル441 への入口において利用可能となるまで、DNA を溜440 に向けて動かす。溜438 および434 に対する電界を単に切り換えて、439 における検出のためにDNA を分離することによって、DNA の注入を達成する。

【0120】

以上の結果から明らかなように、現在入手可能なCEおよびMCE 装置を超えた有意な利点を提供する、好都合な、統合マイクロチャンネル電気泳動装置が開示された。本発明の装置は電気泳動流路としてマイクロチャンネルを含むので、急速運転時間、小さい試料体積の使用の可能性、高い分離効率、およびその他を包含する、CEおよびMCE 装置の利益のすべてを提供する。本発明の統合装置は濃縮チャンネルを含むので、フェムトモル～ナノモルの範囲の分析物濃度を含む複雑な試料マトリックスの分析のために使用することができる。しかしながら、濃縮チャンネルおよび主電気泳動流路の特定の位置関係のために、オン・ライン配置の欠点、例えば、バンドの拡大およびその他は本発明の装置において発生しない。本発明の装置は統合されておりかつコンパクトであるので、取扱いが容易でありかつ自動化装置とともに容易に使用することができる。最後に、材料を適当に選択することによって、使い捨て可能であるように装置を製作することができる。本発明の装置は汎用性および感受性を提供するので、この装置は臨床的電気泳動アッセイを含む広範な種類の用途において使用するために適当である。

【0121】

この明細書中に記載したすべての刊行物および特許出願は、各個々の刊行物および特許出願が引用することによって本明細書の一部とされると特定のにかつ個々に示されるのと同じ程度に、引用することによって本明細書の一部とされる。

本発明は詳しく記載されたので、当業者にとって明らかなように、本発明の精神および範囲から逸脱しないで種々の変化および変更が可能である。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、本発明による装置において使用する濃縮チャンネルの線図である。

【図2】

図2は、本発明の装置において使用するためにまた適当な濃縮チャンネルの別の態様の線図である。

【図3A】

図3Aは、本発明による装置の上面線図である。

【図3B】

図3Bは、図3Aの装置の側面図である。

【図4】

図4は、本発明の他の態様の上面線図である。

【図5】

図5は、濃縮チャンネルが単一の流体の入口および出口を含む、本発明の態様の線図である。

【図6】

図6は、濃縮チャンネルが、図1 および図2 に示すような、クロマトグラフ材料の代りに電気泳動ゲル媒質を含む、本発明による装置の線図である。

【図7】

図7は、本発明によるディスク形装置の上面線図である。

【図8】

図8は、図1 または図2 におけるような装置のフローダイヤグラムである。

【図 9】

図 9 は、図 3A、図 3B におけるような装置のフローダイアグラムである。

【図 10】

図 10 は、図 4 におけるような装置のフローダイアグラムである。

【図 11】

図 11 は、図 5 におけるような装置のフローダイアグラムである。

【図 12】

図 12 は、図 6 におけるような装置のフローダイアグラムである。

【図 13】

図 13 は、図 7 におけるような装置のフローダイアグラムである。

【図 14】

図 14 は、本発明による装置の 1 態様の一部分のフローダイアグラムであり、分離チャンネルへの多数の入口を示す。

【図 15】

図 15 は、本発明による装置の 1 態様のフローダイアグラムであり、主電気泳動流路と二次電気泳動流路との間の別の立体配置を示す。

【図 16】

図 16 は、本発明による装置の 1 態様のフローダイアグラムであり、濃縮チャンネルから下流に直列に配置された複数の分析ゾーンを示す。

【図 17】

図 17 は、本発明による装置の 1 態様のフローダイアグラムであり、濃縮チャンネルから下流に並列に配置された複数の分析ゾーンを示す。

【図 18】

図 18 は、本発明による装置の 1 態様のフローダイアグラムであり、濃縮チャンネルから下流の複数の主電気泳動流路を示す。

【図 19】

図 19 は、本発明による装置の 1 態様のフローダイアグラムであり、並列に配置された複数の主電気泳動流路を示す。

【図 20】

図20は、図15に示す装置に類似し、そして試薬を溜から主電気泳動流路に直接運搬する試薬流路をさらに有する、本発明による装置の1 態様のフローダイアグラムである。

【図21】

図21は、図16に示す装置に類似し、そして試薬を溜から主電気泳動流路に直接運搬する試薬流路をさらに有する、本発明による装置の1 態様のフローダイアグラムである。

【図22】

図22は、それぞれ、図17に示す装置に類似し、そして試薬を溜から主電気泳動流路の下流の分岐に直接運搬する複数の試薬流路をさらに有する、本発明による装置の1 態様のフローダイアグラムである。

【図23】

図23は、濃縮媒質がコーティングされた磁気物体を含む、本発明による装置の1 態様のフローダイアグラムである。

【図24】

図24は、例7 に記載するDNA 捕捉法において使用することができるような、本発明による装置の態様を示すフローダイアグラムである。

【図25】

図25は、例7 に記載するDNA 捕捉法において使用することができるような、本発明による装置の態様を示すフローダイアグラムである。

【図26】

図26は、例7 に記載するような5-デチオビオチン- プライマー構築物の合成を示す反応スキームである。

【図27】

図27は、並列に配置されたアフィニティーゾーンにおけるアフィニティー結合の捕捉および解放により、生物学的実在物の混合物を4 つの異なるサブセットに分離するために使用できるような、本発明による装置の1 態様のフローダイアグラムである。

【図1】

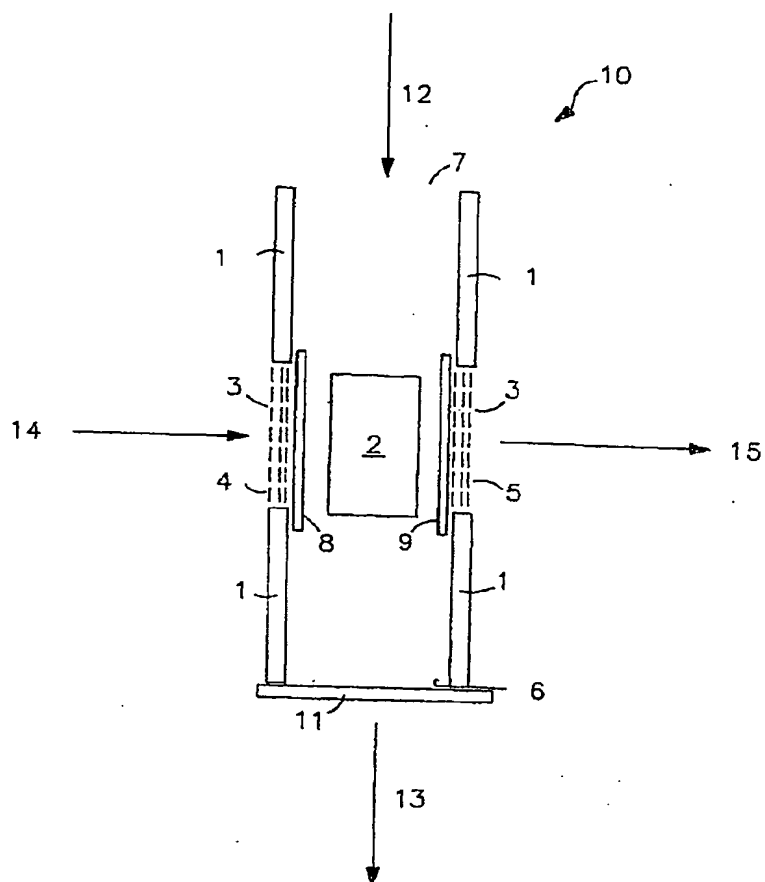


FIG. 1

【図2】

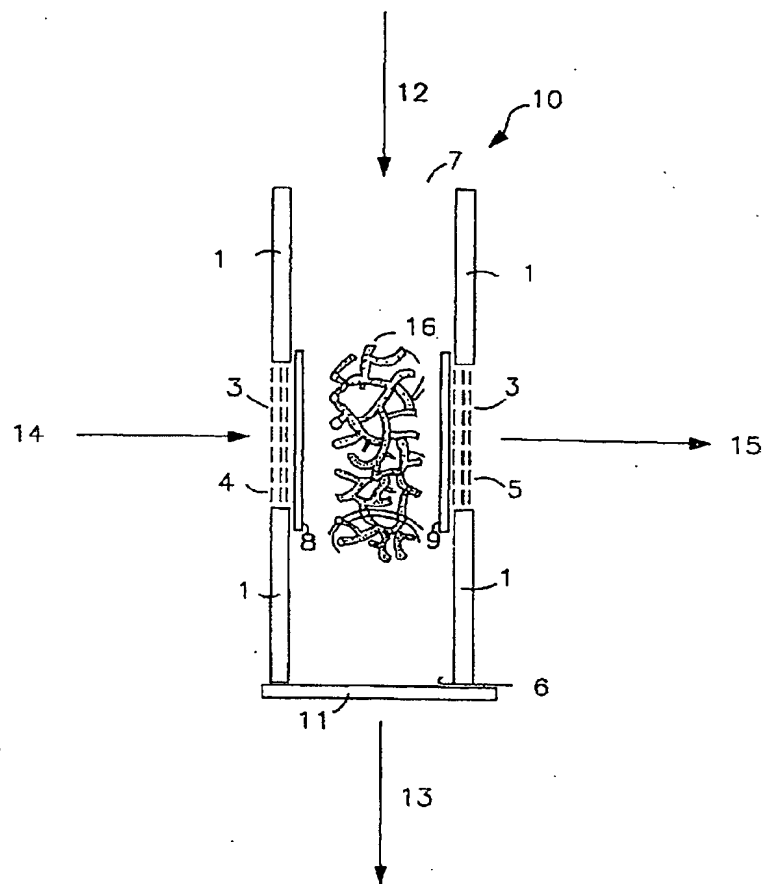


FIG. 2

【図3】

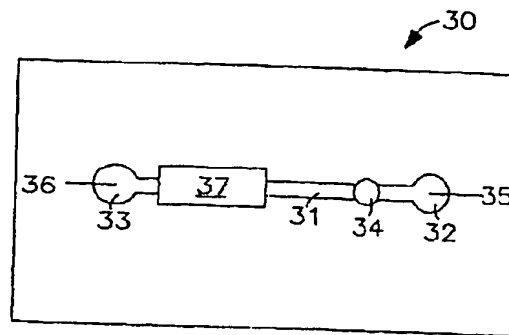


FIG. 3A

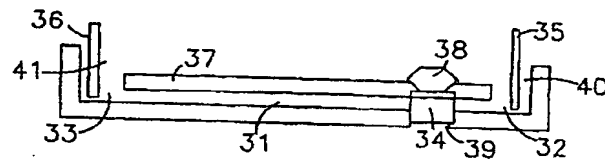


FIG. 3B

【図4】

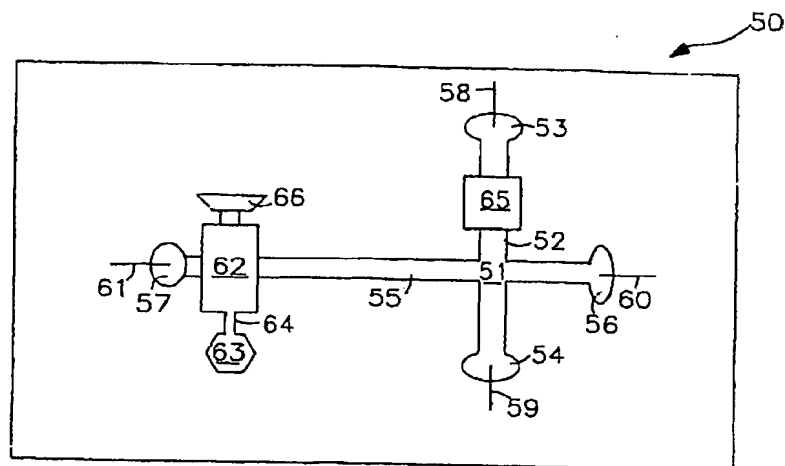


FIG. 4

【図5】

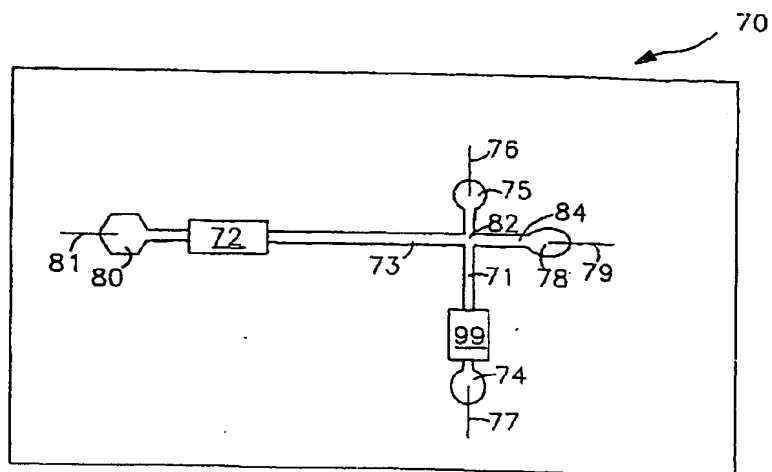


FIG. 5

【図6】

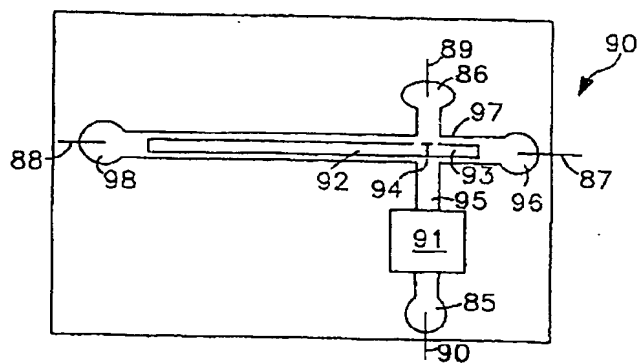


FIG. 6

【図7】

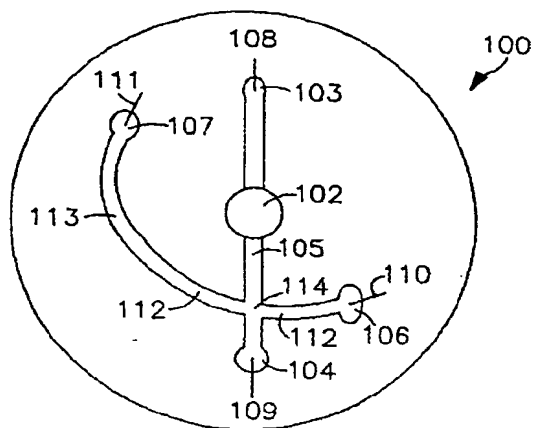


FIG. 7

【図8】

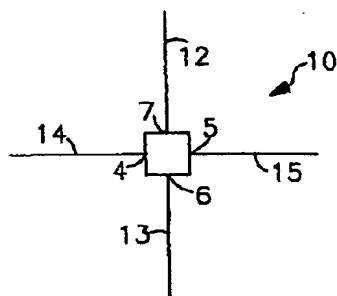


FIG. 8

【図9】

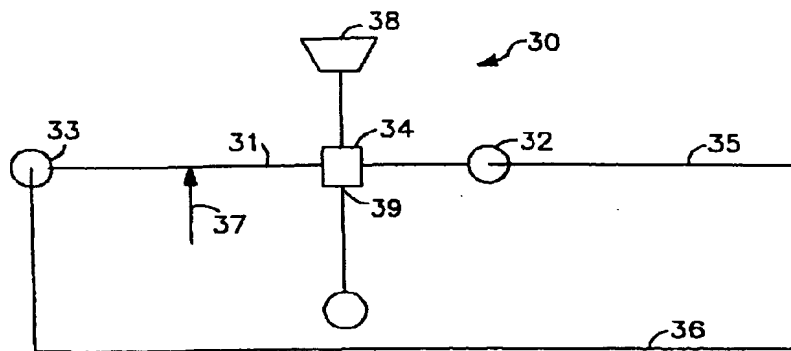


FIG. 9

【図10】

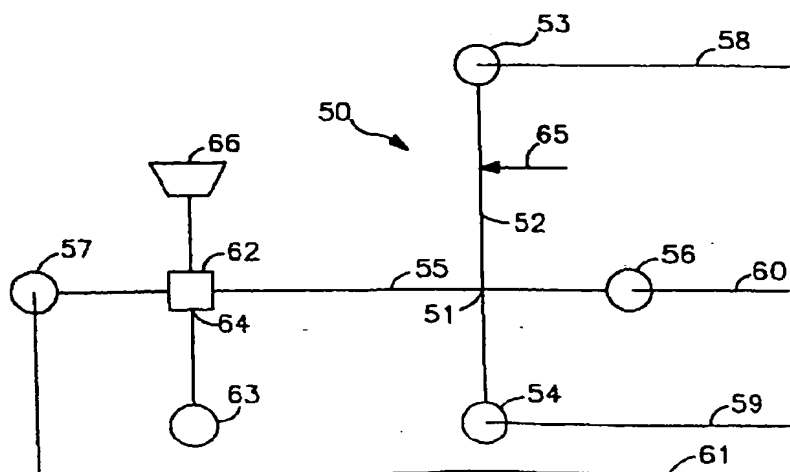


FIG. 10

【図11】

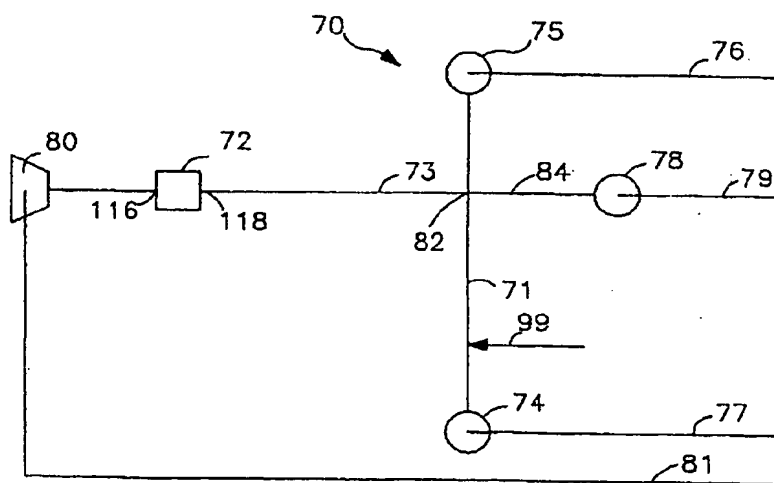


FIG. 11

【図12】

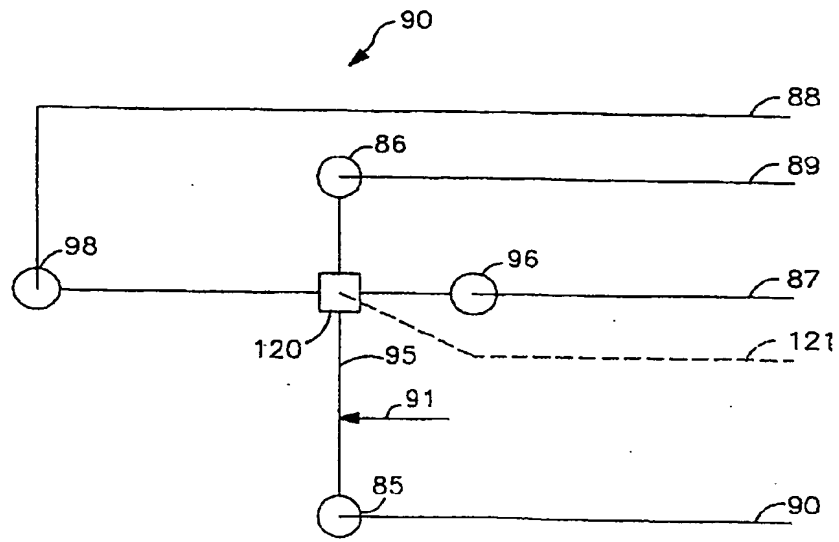


FIG. 12

【図13】

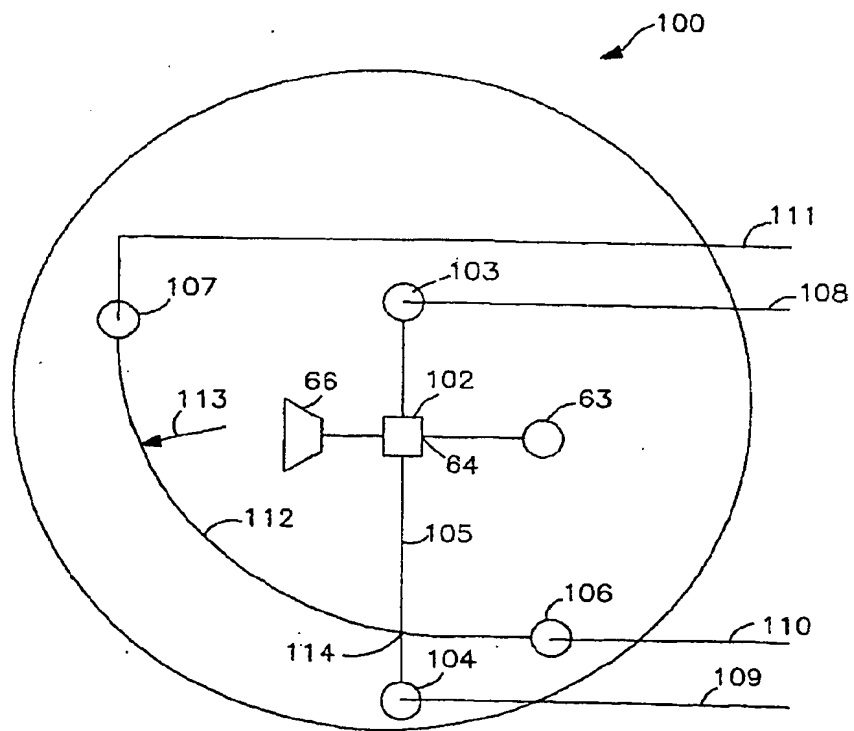


FIG. 13

【図14】

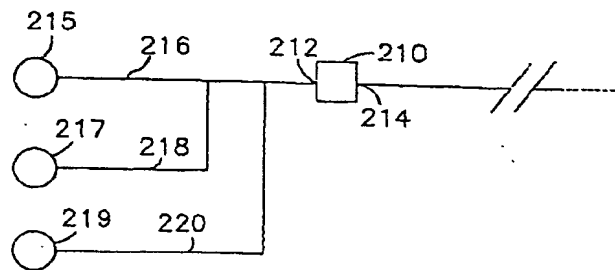


FIG. 14

【図15】

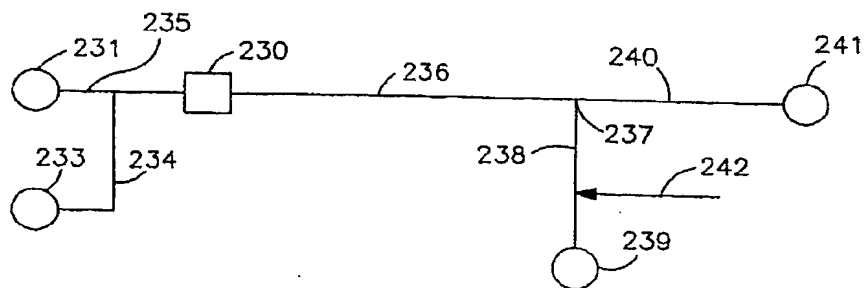


FIG. 15

【図16】

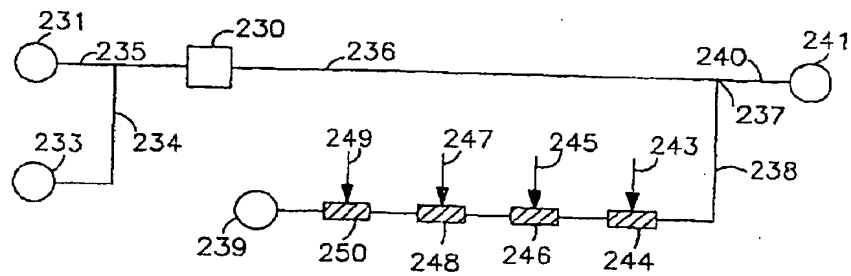


FIG. 16

【図17】

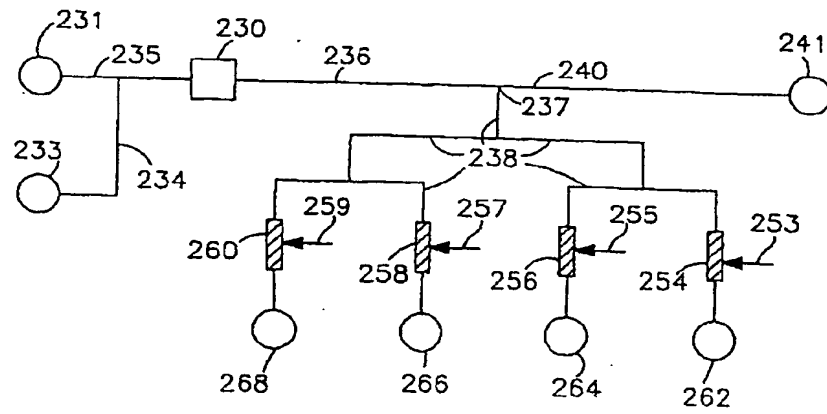


FIG. 17

【図18】

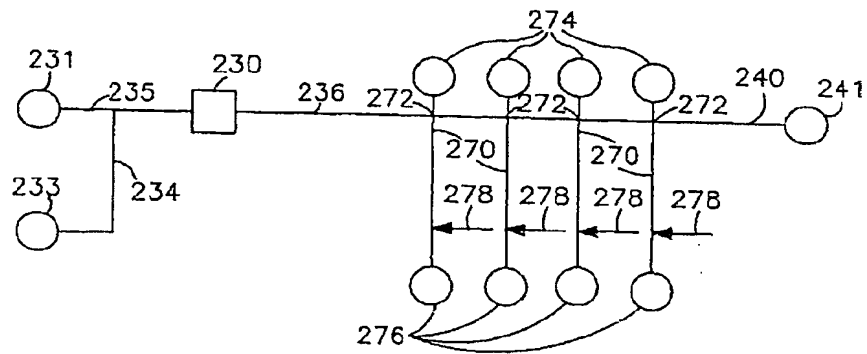


FIG. 18

【図19】

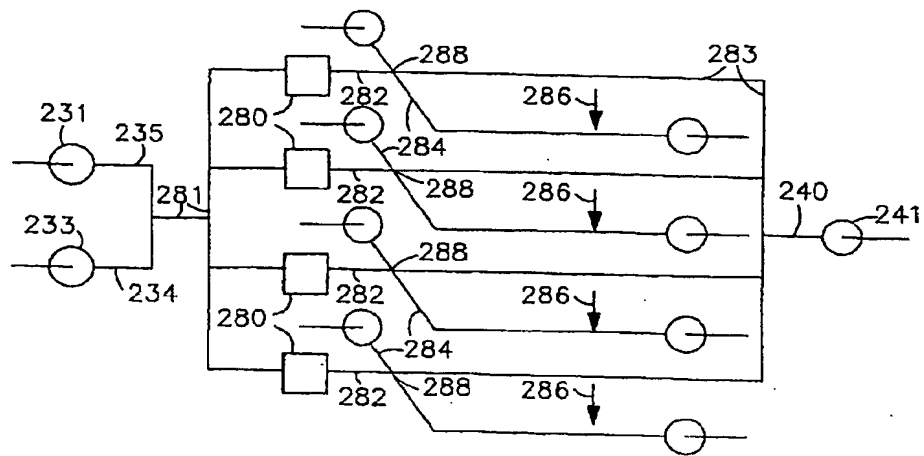


FIG. 19

【図20】

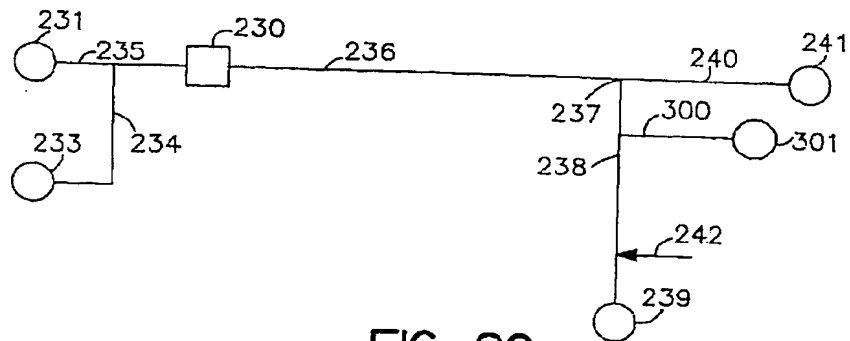


FIG. 20

【図21】

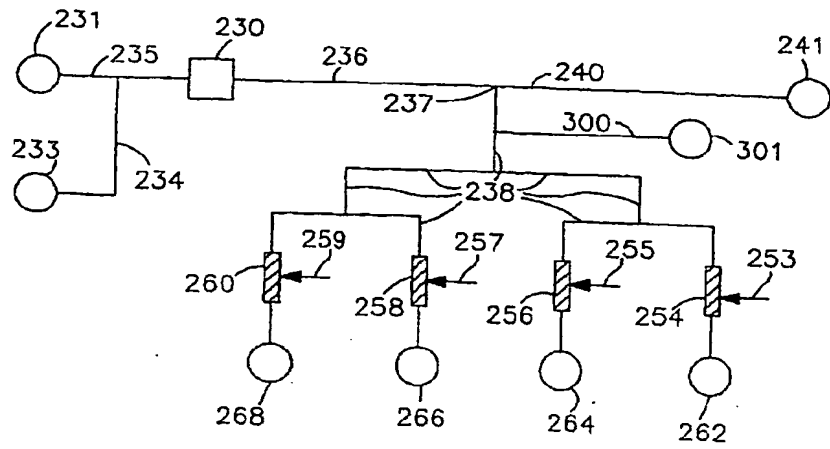


FIG. 21

【図22】

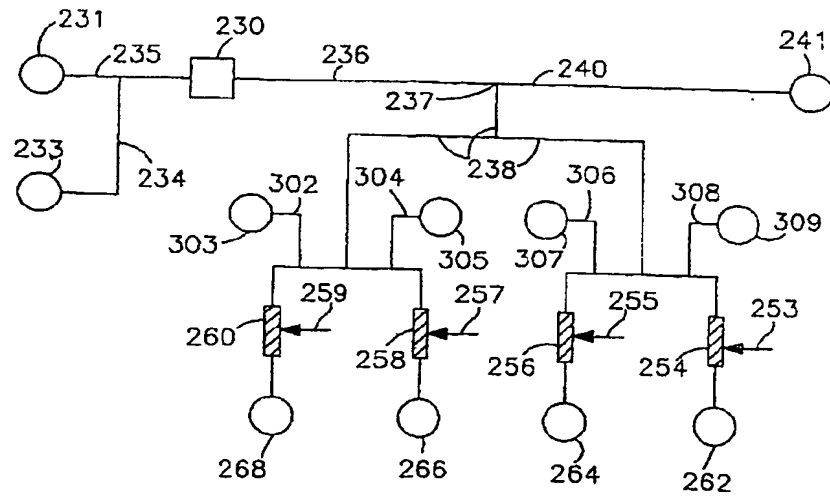


FIG. 22

【図 23】

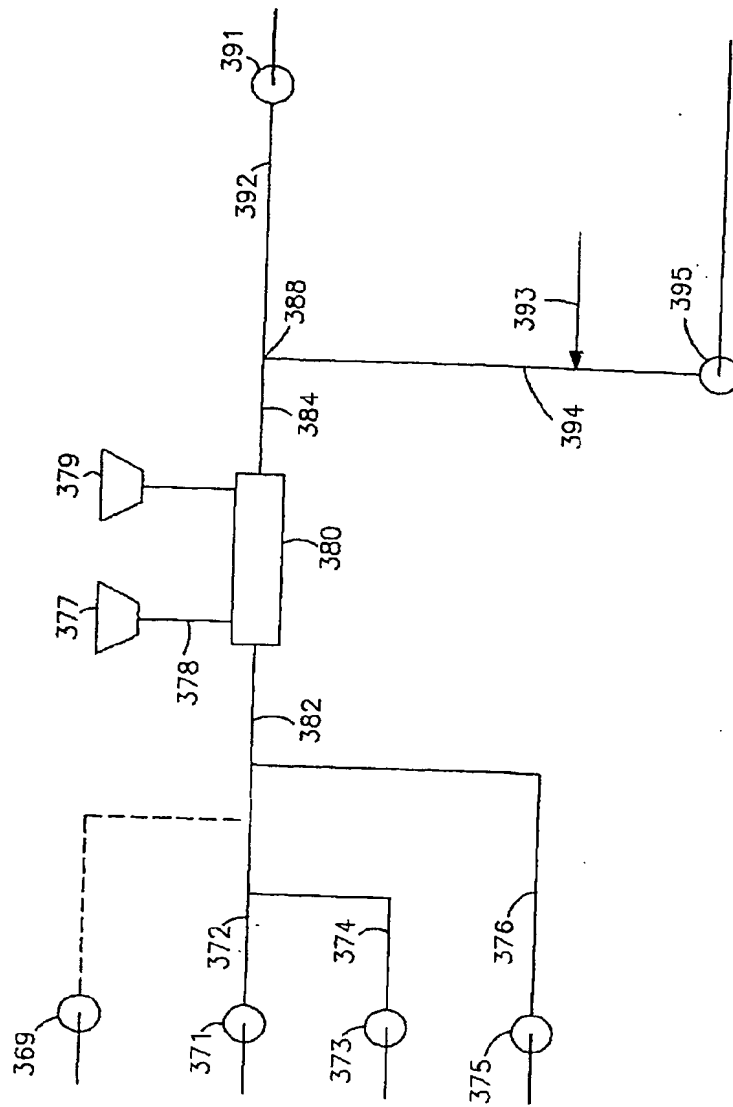


FIG. 23

【図 24】

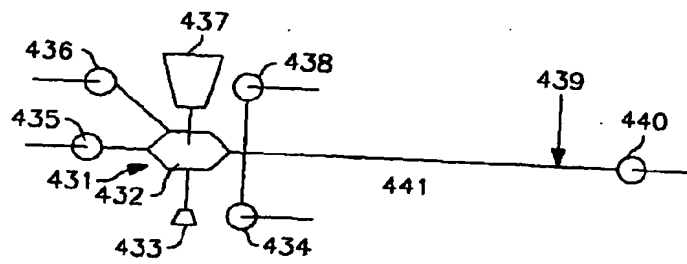
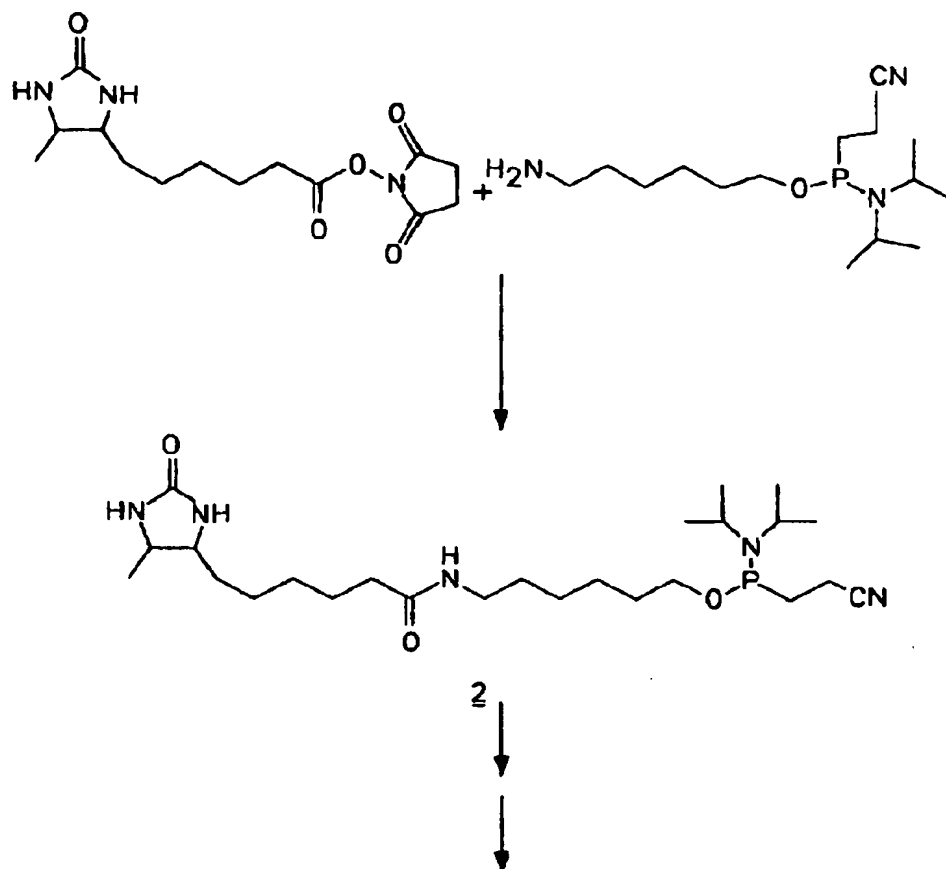


FIG. 24

FIG. 25

【図26】



5'-チチオビオチン-プライマー

FIG. 26

【図27】

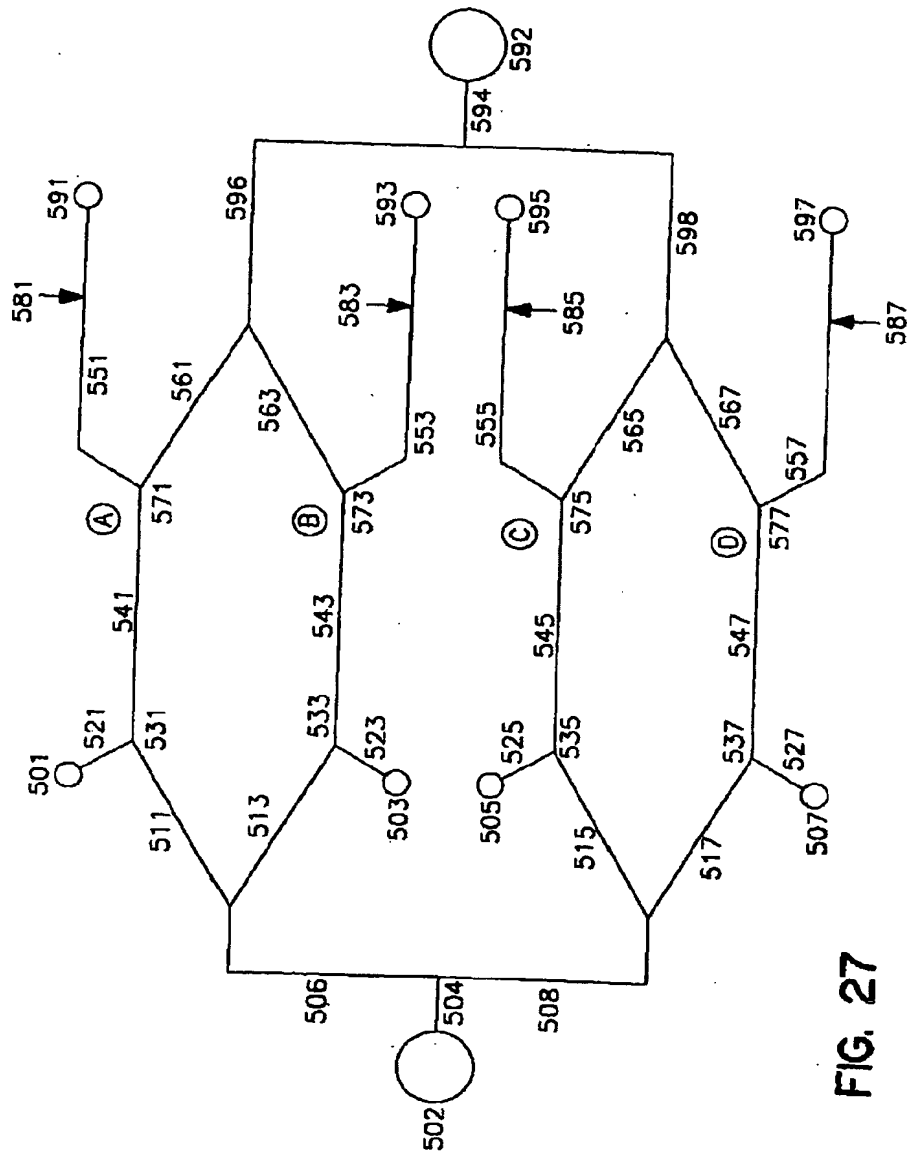


FIG. 27

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US99/02099

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(6) : C12M 1/00; C12Q 1/68; G01N 27/26, 27/447, 33/48, 33/50, 33/53
US CL : 204/451,601; 435/6,7,1,287.2; 436/90,501; 536/73.1

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 204/450-451,600-605; 422/52,53,63; 435/6,7,1,287.2; 436/52,53,63,90,501; 536/73.1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
noneElectronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Please See Extra Sheet.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A,P	US 5,770,029 A (NELSON et al.) 23 June 1998, entire document.	1-31
A	US 5,427,946 A (KRICKA et al) 27 June 1995, fig.9 & example 3.	1-31

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"B" earlier document published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 APRIL 1999

Date of mailing of the international search report

20 MAY 1999

Name and mailing address of the ISA/US
Commissioner of Patents and TrademarksBox PCT
Washington, D.C. 20231

Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer

JOHN S. STATSIK JR.

Telephone No. (703) 308-0661

BRIAN A. HARDEN
PARALEGAL SPECIALIST
GROUP 1/00

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US99/02099

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Please See Extra Sheet.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US99/02099**B. FIELDS SEARCHED**

Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used):

USPAT, JPOABS, EPOABS, CAPLUS, WPIDS

Search terms: cell#, DNA, nucleic, oligonucleotide#, polynucleotide#, sort?, separat?, electrode#, microchip#, microfluidic, microfabrical?, micromachined, mesoscale

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION WAS LACKING

This ISA found multiple inventions as follows:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I, claim(s) 1-6, drawn to a method for analyzing a micromixture of first and second biological cells.

Group II, claim(s) 7-31, drawn to a method for nucleic acid sample cleanup.

The inventions listed as Groups do not relate to a single inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical feature of Group I is the separation of a micromixture of first and second biological cells and the special technical feature in group II is the cleanup of a nucleic acid sample. Since the special technical feature of Group I is not present in Group II and the special technical feature of Group II is not present in Group I, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード(参考)
G O 1 N 33/53		G O 1 N 27/26	3 3 1 E
(72)発明者	フーパー, ハーバート エイチ. アメリカ合衆国, カリフォルニア 94002, ベルモント, コビントン ストリート 823		
(72)発明者	ハウザー, アラン ケー. アメリカ合衆国, カリフォルニア 94301, パロ アルト, ハミルトン アベニュー 632		
(72)発明者	シン, シャラット アメリカ合衆国, カリフォルニア 95135, サン ホセ, ロイヤル ミードウ レーン 3420		
(72)発明者	ウィリアム, スティーブン ジェイ. アメリカ合衆国, カリフォルニア 94010, バーリンゲーム, ローレル アベニュー 710		
(72)発明者	サッシ, アレキサンダー ピー. アメリカ合衆国, カリフォルニア 94704, バークレイ カレッジ アベニュー 2617 #12		
F ターム(参考)	2G045 AA34 AA35 BB52 DA12 DA13 DA14 DA36 FA36 FB01 FB05 HA09 HA14 JA07 4B029 AA07 BB11 FA12 4B063 QA01 QA13 QA19 QQ03 QQ42 QR32 QR42 QR48 QR54 QR62 QS16 QS24 QS25		

PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification 6 : C12M 1/00, C12Q 1/68, G01N 27/26, 27/447, 33/48, 33/50, 33/53		A1	(11) International Publication Number: WO 99/40174
			(43) International Publication Date: 12 August 1999 (12.08.99)
(21) International Application Number: PCT/US99/02099		(81) Designated States: AU, CA, JP, European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) International Filing Date: 1 February 1999 (01.02.99)		Published With international search report.	
(30) Priority Data: 09/018,918 5 February 1998 (05.02.98) US			
(71) Applicant: ACLARA BIOSCIENCES, INC. (US/US); 3906 Trust Way, Hayward, CA 94545 (US).			
(72) Inventors: NELSON, Robert, J.; 909 Marina Village Parkway #145, Alameda, CA 94501 (US). HOOPER, Herbert, H.; 823 Covington Street, Belmont, CA 94002 (US). HAUSER, Alan, K.; 632 Hamilton Avenue, Palo Alto, CA 94301 (US). SINGH, Shant, 3420 Royal Meadow Lane, San Jose, CA 95135 (US). WILLIAMS, Stephen, J.; 710 Laurel Avenue, Burlingame, CA 94010 (US). SASSI, Alexander, P.; 2617 College Avenue #12, Berkeley, CA 94704 (US).			
(74) Agents: BACHAND, Edward, N. et al.; Flehr, Hohbach, Test, Albritton & Herbert LLP, 4 Embarcadero Center, Suite 3400, San Francisco, CA 94111-4187 (US).			
(54) Title: INTEGRATED MICROFLUIDIC DEVICES			
(57) Abstract			
<p>Integrated microfluidic devices comprising at least an enrichment channel (10) and a main electrophoretic flowpath (12) are provided. In the subject integrated devices, the enrichment channel and the main electrophoretic flowpath are positioned so that waste fluid flows away from said main electrophoretic flowpath through a discharge outlet (6). The subject devices find use in a variety of electrophoretic applications, including clinical assays, high throughput screening for genomics and pharmaceutical applications, point-of-care <i>in vivo</i> diagnostics, molecular genetic analysis and nucleic acid diagnostics, cell separations, and bioresearch generally.</p>			

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.